

# Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-511423

(43) 公表日、平成8年(1996)12月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00
A 6 1 K 31/70	A C A	8314-4C	A 6 1 K 31/70
35/76		7431-4C	35/76
48/00		8314-4C	48/00
C 1 2 N 5/10		9452-4B	C 1 2 P 21/02
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全115頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平7-501744	(71) 出願人	ジェネティック セラピー, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)4月13日		アメリカ合衆国, 20878 メリーランド,
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)12月11日		ゲイザースバーグ, クロップー ロード
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 0 4 0 7 5		938
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 2 9 4 7 1	(72) 発明者	コネリ, シーラ
(87) 国際公開日	平成6年(1994)12月22日		アメリカ合衆国, 20878 メリーランド,
(31) 優先権主張番号	0 8 / 0 7 4 , 9 2 0		ゲイザースバーグ, クインス オーチャー
(32) 優先日	1993年6月10日		ド プールバード 783, アpartment
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	弁理士 丹羽 宏之
(31) 優先権主張番号	0 8 / 2 1 8 , 3 3 5		
(32) 優先日	1994年3月25日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血友病治療のためのアデノウイルスベクター

(57) 【要約】

凝固因子、例えば因子VIIIあるいは因子IXなどをコード化する少くとも1個のDNA配列を含む一つのアデノウイルスベクター。このようなベクターは宿主にある血友病を治療するのに有効な量で宿主に投与することが出来る。このベクターは肝細胞を非常に効率的に感染させ、これにより肝細胞は凝固因子をコード化するDNA配列を発現する。

## 【特許請求の範囲】

1. 凝固因子をコード化する少くとも 1 個の DNA 配列を含む一つのアデノウイルスベクター。
2. 前記 DNA 配列が因子 VIII あるいは因子 VIII の凝固活性を持つ断片、その誘導体もしくは類似体をコード化することを特徴とする請求の範囲第 1 項記載のベクター。
3. 前記 DNA 配列が因子 IX あるいは因子 IX の凝固活性を持つ断片、その誘導体もしくは類似体をコード化することを特徴とする請求の範囲第 1 項記載のベクター。
4. アデノウイルスベクターを生成する一つのプラスミドベクターであって、前記プラスミドベクターが凝固因子をコード化する少くとも 1 個の DNA 配列を含むプラスミドベクター。
5. 宿主にある血友病を治療する一つの方法であって、前記宿主に請求の範囲第 1 項記載のアデノウイルスベクターを投与し、前記ベクターは前記宿主にある血友病の治療に有効な量で投与されることよりなる一つの方法。
6. 前記ベクターが更に組織特異的プロモーターを含むことを特徴とする請求の範囲第 2 項記載のベクター。
7. 前記組織特異的プロモーターがマウスアルブミンプロモーターであることを特徴とする請求の範囲第 6 項記載のベクター。
8. 前記ベクターが更に組織特異的でないプロモーターを含むことを特徴とする請求の範囲第 3 項記載のベクター。
9. 組織特異的プロモーターでない前記プロモーターがラウス肉腫ウイルスプロモーターであることを特徴とする請求の範囲第 8 項記載のベクター。
10. 前記ベクターが更に少くとも 1 個のゲノム要素を含むことを特徴とする請求の範囲第 3 項記載のベクター。
11. 前記ゲノム要素が因子 IX DNA 配列の全 3' 未翻訳領域であることを特徴とする請求の範囲第 10 項記載のベクター。

12. 前記ベクターが更に因子IX DNA配列の全5'末翻訳領域を含むことを特徴とする請求の範囲第11項記載のベクター。

13. 前記ベクターが因子IX DNA配列の全3'末翻訳領域、因子IX DNA配列の全5'末翻訳領域および因子IX DNA遺伝子の中心切形第一イントロンを含むことを特徴とする請求の範囲第10項記載のベクター。

14. 前記ベクターが更に因子IX遺伝子の全第七イントロンを含むことを特徴とする請求の範囲第10項記載のベクター。

15. 前記ベクターが更に少なくとも1個のゲノム要素を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載のベクター。

16. 前記ベクターがA p o A 1プロモーターを含むことを特徴とする請求の範囲第15項記載のベクター。

17. 前記ベクターが更にアポリポタンパク質A-1遺伝子の第一イントロンを含むことを特徴とする請求の範囲第16項記載のベクター。

18. 前記ベクターが更にアポリポタンパク質A-1遺伝子の第一エキソンを含むことを特徴とする請求の範囲第16項記載のベクター。

19. 前記ベクターが更にアポリポタンパク質A-1遺伝子の第一イントロンおよびアポリポタンパク質A-1遺伝子の第一エキソンを含むことを特徴とする請求の範囲第16項記載のベクター。

20. 異種タンパク質をコード化する少なくとも1個のDNA配列および異種タンパク質をコード化する前記少なくとも1個のDNA配列の発現に作用する少なくとも1個のゲノム要素を含む一つのアデノウイルスベクター。

## 【発明の詳細な説明】

### 血友病治療のためのアデノウイルスベクター

この出願は1993年6月10日受理された出願番号074,920を部分継承するものである。

### 発明の分野

この発明はアデノウイルスベクターに関する。より詳細には、この発明は血友病治療に使用されるアデノウイルスベクターに関する。

### 発明の背景

血友病AおよびBは、それぞれ凝固因子VIIIおよびIXの欠損により生じるX連鎖劣性出血疾患である。アメリカ合衆国では血友病Aの患者約17,000人および血友病Bの患者2,800人が存在する。両血友病の臨床上の説明は、自発的かつ長びく出血という出来事である。患者はしばしば関節出血に苦しみ、これが障害性関節症に導く。現在の治療は、血友病Aに対してプラスマ誘導凝固因子、すなわち組換え因子VIIIを静脈内注入して出血をとめることに向けられる。しかし治療は凝固因子の利用可能性、生体内での短い半減期、および1年に優に100,000ドルに達する高い治療費により限定される。

遺伝子治療は血友病治療の新しい方法についての将来の見込みを提供する。研究者のいくつかのグループが因子VIIIおよび因子IXをコード化するRNAを含むレトロウイルスベクター

についての研究を実施した。実質的にこのようなベクターで生体内にこれらの因子の治療レベルを産み出すための今日までのすべての試みは成功していない。因子VIIIに対するcDNAおよびRNAはとりわけ動かすことが困難である。

ヘーベン、他、生物科学ジャーナル、265巻、7318-7323ページ（1990年）およびイスラエル、他、血液、75巻、5号、1074-1080ページ（1990年3月1日）は、B領域欠失ヒト因子VIIIをコード化するDNA（RNA）を含むレトロウイルスベクターを用いた試験管内マウス繊維芽細胞の感染を記述している。この感染細胞は試験管内での機能的ヒト因子VIIIを発現することが発見されてはいるが、タンパク質は低水準で発現されたに過ぎなかつ



た。

最近ヘーベン、他、ヒト遺伝子治療、4巻、179-186ページ(1993年)はヒト因子VIIIをコード化するDNAを含むレトロウイルスベクターで繊維芽細胞を感染させた。これらの細胞は次いで免疫不全マウスに移植された。移植2ヶ月後に移植組織から回収された細胞は組織培養で再成長した時にまだ因子VIIIを分泌する性能を持っていたが、ヒト因子VIIIは受容体マウスのプラスマサンプル内では検出されなかった。

リンチ、他、ヒト遺伝子治療、4巻259-272ページ(1993年)はヒト因子VIII cDNAを含むレトロウイルスベクターのプラスミド形態を用いたPE501パッケージング細胞の形質移入を記述している。このウイルスは収穫され、両栄養性レトロウイルスパッケージング細胞を感染するのに使用された。

しかし感染細胞はヒト因子VIIIおよびウ

イルス力価を他のcDNAを含む類似のレトロウイルスベクターより大きさが約

2ランク低い量で生産したに終わった。リンチ、他は更に他のcDNA配列と比較してヒト因子VIII配列を含むベクターRNAの累積が100倍も少ないことを発見した。

リンチ、他は因子VIIIに取り組み次のような難点について報告している。高力価因子VIII含有レトロウイルスベクター株は生成が困難であり、因子VIII cDNA配列含有レトロウイルスベクターは因子VIII cDNA配列の部分再配列およびもしくは欠失させる傾向がある。更に因子VIII mRNAはもともと不安定である。またB領域欠失因子VIIIコーディング領域は1-2キロベースRNA累積阻害シグナルを含む。

かくしてこの文献は因子VIIIによる遺伝子治療にレトロウイルスを用いるアプローチで作業することは重要な問題があり、また僅か限定された発現が行われたに過ぎなかったことを開示する。出願人はヒト因子VIIIが動物モデルで発現されたという報告について知っていない。

研究者達は更にレトロウイルスベクターを用いる因子IXの治療水準を達成することにも大きな困難を経験した。

パーマー、他、血液、73巻、2号、438-445ページ（1989年2月）はヒト因子IXをコード化するDNA（RNA）を含むレトロウイルスベクターを用いたヒト皮膚繊維芽細胞の形質導入を開示する。この形質導入繊維芽細胞は次いでラットおよびヌードマウスに供与された。このような繊維芽細胞はヒト因子IXを動物血液中に190 ng/mlまでの量

で過渡的に発現することが発見されたが、この量は治療水準にあるとは一般に考えられていない。

シャーフマン、他、全米科学アカデミー紀要、88巻、4626-4630ページ（1991年6月）はジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）プロモーターの制御下でβガラクトシダーゼを含むレトロウイルスベクターを使ったマウス繊維芽細胞移植片の形質導入を開示する。この繊維芽細胞は次いでマウスに移植され、60日目までにβガラクトシダーゼ遺伝子の発現が得られた。シャーフマン、他はイヌ因子IXで形質導入された繊維芽細胞を開示するが、彼等は短期間および非治療水準の発現を得たに過ぎなかった。

ディ、他、全米科学アカデミー紀要、89巻、10892-10895ページ（1992年11月）はマウス筋クレアチンキナーゼエンハンサーおよびヒトサイトメガロウイルスプロモーターの制御下でイヌ因子IX DNAを含むレトロウイルスベクターを用いるマウス一次筋芽細胞の形質移入を開示する。形質移入筋芽細胞は次いでマウスの後脚に注入された。6ヶ月間にわたるイヌ因子IXの発現が得られた。しかしプラスマ内に分泌される因子IXの定常状態水準（10<sup>7</sup>注入細胞に対し10 ng/ml）は治療価値としては十分なものではない。

ジェラード、他、自然遺伝学、3巻、180-183ページ（1993年2月）は、レトロウイルスLTRの制御下でヒト因子IX遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いる一次ヒトケラチノサイトの形質移入を開示する。形質転換

ケラチノサイトは次いでヌードマウスに移植され、またヒト因子IXは約1週間後に血流内で検出された。しかし因子IXの量は2.5 ng/ml、つまり治療用量の約1%に過ぎなかった。

ケイ、他、サイエンス、262巻、117-119ページ（1993年10月1日）は因子IXのDNAを含むレトロウイルスベクターの部分肝切除の後のイヌ門脈血管系への直接注入を開示する。この動物は5ヶ月間以上にわたりイヌ因子IXを低水準で発現した。このような因子IXの発現は治療される動物の全血血餅形成時間および部分トロンボプラスチン時間を減少させることにはなつたけれども、この技術がヒトに適用される前に因子IXの水準を高めることがまず達成されなければならないと著者は述べた。

ズー、他、中国における科学、36巻、9号、33-41ページ（1993年9月）はヒト因子をコード化するDNAを含むレトロウイルスベクターによるラビット皮膚繊維芽細胞の形質移入を開示する。この繊維芽細胞は次いで自己移植あるいは同種移植としてラビットに移植された。ヒト因子IXの発現はラビット内で10ヶ月以上維持された。480 ng/mlまでのラビットプラズマでの因子IXの水準は達成されたと主張された。しかし因子IXを測定するために使用された検定は偽陽性結果を生成するポテンシャルを持つ抗ラビット抗体を採用した。

マラー、他、中国における科学、36巻、11号、1341-1351ページ（1993年11月）およびスー、他、ヒト遺伝子治療、3巻、543-552ページ（1992年）はヒト遺伝子治療実験を開示し、ここでヒト皮膚繊維芽細胞は二人の血友病患者から採取され、ヒト因子IXをコード化するDNAを含むレトロウイルスベクターで形質移入された。この細胞は次いで患者に注射された。一人の患者ではヒト因子IXの濃度は71 ng/mlから220 ng/mlに増加し、最高水準は245 ng/mlになった。この患者の凝固活性は2.9%から標準の6.3%まで増加した。他の患者においては、因子IXのプラズマ水準が130 ng/mlから250 ng/mlに増加し、5.5ヶ月の間220 ng/mlの水準で維持された。しかし凝固活性は増加しなかった。これらの患者に関する前処理因子IXデータが欠乏しているため、治療で見られる因子IXの増加が少しあったことを理解することを困難にしている。

血友病Aおよび血友病Bの遺伝子治療にレトロウイルスを使用する試みについて科学的文献から引き出された結論は、真に一致協力した努力および数多くの試

みにも拘らず、大体においてこの分野はヒト因子VIIIあるいはヒト因子IXを生体内で発現する治療水準を達成するために使用出来るレトロウイルスベクターを生産するのに失敗した。因子VIIIへの取組みが特に困難であり、その結果はいずれも同じように不十分であった。前記の実験戦略は労力を要するものであり臨床的にも出過ぎたものであった。

アデノウイルスベクターはも一つの遺伝子治療へのアプローチを提供する。アデノウイルスゲノムは約36キロベース対

の線形二本鎖DNA分子である。ウイルスゲノムの各端部は逆方向末端反復（すなわちITR）として知られるウイルス複製に必要な短い配列を持つ。アデノウイルスについてよく特性付けられた分子遺伝学が遺伝子移転に対し有利なベクターを提供する。ウイルスゲノムの一部は外来起点のDNAで代替することが出来る。加えて組換え型アデノウイルスは構造上安定しており、大規模な増幅後でも再配列ウイルスは観察されていない。

組換え型アデノウイルスは数多くの細胞型への遺伝子転移に有効なベクターとして使用されてきた。以下にある肝細胞形質導入についてのいくつかの報告がある。ジャック、他、自然遺伝学、1巻、372-378ページ（1992年）、（アルファ-1-抗トリプシン）；リ、他、ヒト遺伝子治療、4巻、403-409ページ（1993年）（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ）；ストラットフォード-ペリコードット、他、ヒト遺伝子治療、1巻、241-256ページ（1990年）（オルニチントランスカルバミラーゼ）；スミス、他、自然遺伝学、5巻、397-402ページ（1993年）（因子IX）；およびアメリカ医学協会ジャーナル、269巻、7号、838ページ（1993年2月17日）（マーカートンパク質）。

因子VIIIは肝細胞で主として合成されるため（ケリー、他、英国血液学ジャーナル、56巻、535-543ページ（1984年）；ワイオン、他、ネイチャー、317巻、726-729ページ（1985年）；ゼレコフスカ、他、ネイチャー、317巻、729-732ページ（1985

年) )、因子VIII含有組換え型アデノウイルスで肝細胞を形質導入すると、因子VIIIタンパク質の生体内での発現を生成し、血友病Aに対する有効な遺伝子治療に基礎を置く療法となる。

発明者は動物宿主に投与した際に凝固因子の治療水準を生み出す高力価で安定したアデノウイルスの生産方法を発見した。これらのベクターは遺伝子の転移を生体内で媒介し、これまでに記述されたものに比べて治療実験観察記録を労力が少なく出過ぎてもないものとしている。

#### 図面の簡単な説明

この発明は下記の図面と関連してこれから説明される。ここでは、図1はプラスミドpG1の構築の工程図である。図2はpG1プラスミド内での多重クローニング部位の配列である。図3はプラスミドpG1の地図である。図4はプラスミドpG1H9の地図である。図5はプラスミドphfacIXの地図である。図6はプラスミドpG1H9Bの地図である。図7はプラスミドpHRの構築の工程図である。図8はITR、包膜シグナル、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、アデノウイルス三部分リーダー配列、およびPCR増幅を用いる結合配列の集合の工程図である。

図9はpAvS6の構築の工程図である。

図10はpAvS6の地図である。

図11はヒト因子IXcDNA配列である。

図12はpAvS6H9Bの地図である。

図13はAv1H9B生成の工程図である。

図14はAv1H9Bの実質細胞内注射あるいは門静脈内注射で与えられるマウス内の因子IXプラスマ水準のグラフである。

図15はマウス肝臓における因子IXDNAの存在を確認するためのサザン分析のオートラジオグラムである。

図16はプラスミドpMT2LAの地図である。

図17はB領域欠失ヒト因子VIIIcDNAの配列である。

図18はプラスミドpAvS6H81の地図である。

図19はAv1H81構築の工程図である。

図20はプラスミドpAT2-3eGの地図である。

図21はプラスミドpAvAL1の地図である。

図22はプラスミドpGEM(sac)の地図である。

図23はプラスミドpGEMの地図である。

図24はプラスミドpGEMalbの地図である。

図25はプラスミドpGEMalbF8Bの地図である。

図26はプラスミドpAvALH81の地図である。

図27はプラスミドpgemF8B2の地図である。

図28はプラスミドpBGS19-AIgIの地図である。

図29はプラスミドpUC19の地図である。

図30はプラスミドpUC19-AIgIの地図である。

図31はプラスミドpBGS19の地図である。

図32はプラスミドpGemAPF8Bの地図である。

図33はプラスミドpAvAPH81の地図である。

図34はプラスミドpGemAPexF8の地図である。

図35はプラスミドpALAPF8Bの地図である。

図36はプラスミドpAvALAPH81の地図である。

図37はAv1ALH81生成の工程図である。

図38はAv1ALH81 DNAの制限消化分析のプロット(点染)である。

。

図39はアデノウイルスベクターAd5-d1327, Av1ALH81、およびAv1ALAPH81の工程図である。

図40はヒト因子VIII特異的エリザ検定の標準両対数曲線である。

図41および42は二つの別個の実験でマウスプラスマ内でのヒト因子VIIIの

量の経時変化を示すグラフである。

図43はAv1ALH81の各種用量注入後のマウスプラスマ内でのヒト因子VIIIの生体内発現の経時変化を示すグラフである。

図44および図45は実験用マウスおよび対照マウスのヒト因子VIII半減期を示すグラフである。

図46はAv1ALH81の $4 \times 10^9$  p f uの条件下でマウス内でのヒト因子VIIIの生体内発現を示すグラフである。

図47はプラスミドpBLSKH9C1の地図である。

図48はプラスミドpBLSKH9Dの地図である。

図49はプラスミドpBLH9CINTの地図である。

図50はプラスミドpBLH9EINTの地図である。

図51はプラスミドpBLH9Eの地図である。

図52はプラスミドpBLH9Fの地図である。

図53はプラスミドpAV1H9Dの地図である。

図54はプラスミドpAV1H9ERの地図である。

図55はプラスミドpAV1H9FRの地図である。

図56はAv1H9B、Ad1H9D、Ad1H9ERおよびAd1H9FR

で処理したマウス内での因子IX発現を示すグラフである。

図57は $1 \times 10^9$  p f uのAv1H9B、Ad1H9DあるいはAd1H9ERで処理したマウス内での因子IX発現を持つグラフである。

図58は $5 \times 10^7$  p f uのAd1H9ERあるいはAd1H9FRで処理したマウス内での因子IX発現を示すグラフである。また、

図59はHepG2およびヒラ細胞内での因子IXの試験管内発現、および $2 \times 10^8$  p f uのAv1H9B、Ad1H9D、あるいはAd1H9ERで処理した因子IXの生体内発現を示すグラフである。3個の棒グラフの各グループで、最左端の棒グラフはAv1H9Bに関するデータ、真中はAd1H9D、また最右端の棒グラフはAd1H9ERに関するデータを表している。

この発明の一つの見地に従って、一つの凝固因子をコード化する少くとも1個のDNA配列を含む一つのアデノウイルスベクターが提供される。

ここで使用される「一つの凝固因子をコード化するDNA配列」という用語は、一つの全長凝固因子あるいは凝固因子の断片、誘導体、あるいは類似体をコード化するDNAを意味する。すなわちそのDNAは、全長凝固因子をコード化する全長遺伝子、あるいは切形遺伝子、もしくは凝固因子活性を持つそのような凝固因子の断片あるいは誘導体もしくは類似体をコード化する突然変異遺伝子である。「DNA配列」という用語は一般にポリデオキシリボヌクレオチド分子を言い、より詳細には隣接するペントースの3' および5' 炭素間のホスホジエステル結合により相互に結合した線形系列のデオキシリボヌクレオチドを言う。

一つの実施例において、DNA配列は因子VIIIあるいは因子VIIIの凝固活性を持つその断片、誘導体、あるいは類似体をコード化する。も一つの実施例において、DNA配列は因子IXあるいは因子IXの凝固活性を持つその断片、誘導体、あるいは類似体をコード化する。

ヒト因子IXをコード化するDNA配列は1991年2月19日デイヴィ、他に発行されたアメリカ合衆国特許番号4,994,371およびナショナル リサーチ デベロップメント コーポレーションに発行されたヨーロッパ特許番号EPO 107 278 131 (特許付与公告1989年11月15日)で示され説明される。因子VIIIおよびその断片あるいは誘導体をコード化するDNA配列は1988年7月12日、トゥール、ジュニア他に発行されたアメリカ合衆国特許番号4,757,006、1989年9月19日にトゥー

ル、ジュニア他に発行された同4,868,112、1991年4月2日、クオ、他に発行された同5,004,804、および1992年9月22日スキャンデルラ、他に発行された同5,149,637に示され説明される。

本発明者達は凝固因子をコード化する少くとも1個のDNA配列を含むアデノウイルスベクターで宿主を生体内で感染させることにより、生体内で凝固因子、あるいは凝固因子活性を持つ断片もしくは誘導体あるいは類似体の発現を有効な



治療水準で達成出来ることを発見した。一般にこのような有効治療水準は、凝固因子の正常な水準の約5%もしくはそれ以上であった（北イングランド医療ジャーナル、328巻、7号、453-459ページ（1993年2月1-8日）。血液、74巻、1号、207-212ページ（1989年7月））。この水準は一般に因子VIIIでは約10 ng/mlもしくはそれ以上、また因子IXでは約250 ng/mlもしくはそれ以上であった。

凝固因子をコード化するDNA配列は適切なプロモーターの制御下にある。使用される適切なプロモーターは必ずしもそれに限定されないが、アデノウイルス主要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター；唾液腺ウイルス（CMV）プロモーターなどの異種プロモーター；呼吸シンシチアルウイルスプロモーター；ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター；アルブミンプロモーター；マウス乳がんウイルス（MMTV）プロモーターなどの誘導プロモーター；メタロチオネインプロモーター；熱ショックプロモーター； $\alpha$ -1抗トリプシンプロモーター；B型肝炎表面抗原プロモーター；トランスフェリンプロモーター；アポリポタンパクA-1プロモーター；因子VIIIプロモーター；および因子IXプロモーターを含む。しかしこの発明の範囲は特異的プロモーターに限定されるものではないことは理解されねばならない。

一つの実施例において、DNA配列が因子VIIIあるいはその断片、誘導体、もしくは類似体をコード化する時に、DNA配列を制御するプロモーターは望ましくは例えば肝細胞内で活性であるマウスアルブミンプロモーターなどのような組織特異的プロモーターである。この実施例の範囲はいずれの理論的類推に限定されるものではないが、発明者達は組織特異的プロモーターを使用することにより、生産者細胞に対して起り得る因子VIIIの毒性が避けられるということを確信するものである。

マウスアルブミンが使用される際に、これは肝細胞内で活性であり、アデノウイルスベクターは肝細胞以外の細胞内で選択的に成長する。生成アデノウイルスベクターが宿主に投与される時には、そのベクターは当業者にとって周知の方法により宿主に投与され、これによりベクターは移動し肝細胞を感染させる。感染

肝細胞は次いで治療量で因子VIIIを発現する。因子VIIIは肝細胞に対して毒性がなく、かくして治療水準での発現を続ける。

更にも一つの実施例において、DNAが因子IXあるいはその断片、誘導体、もしくは類似体をコード化する時、DNA

配列を制御するプロモーターは望ましくは例えばラウス肉腫ウイルスプロモーターのような組織特異的ではない強力プロモーターである。因子IXは大抵の細胞に対し毒性ではないと考えられているため、アデノウイルスベクターはいずれの細胞型においても成長し、また患者に対し有効治療量で投与され、これによりアデノウイルスベクターは移動して例えば肝細胞などのような細胞を感染させ、これにより因子IXは治療量で発現されることになるであろう。

遺伝子導入マウスにおいて、cDNAの発現の増加はイントロンと同じく5' および3' 未翻訳領域のとり込みにより得られることがいくつかの報告で明らかにされた（チュー、他、核酸研究、15巻、881-884ページ（1987年）；プリンスター、他、全米科学アカデミー紀要、85巻、836-840ページ（1988年）；ジャラット他、EMBO J.、9巻、10号、3295-3301ページ（1990年）；およびチュー、他、分子細胞生物学、11巻、3070-3074ページ（1991年））。しかしアデノウイルスベクターバックボーンにとり込まれた外因性遺伝子発現の改良におけるゲノム要素の有効性についてはこれまでに示されていない。

一つの実施例において、凝固因子をコード化するDNA配列はまた、発現を高めるためにイントロンおよび他のゲノム要素を含むことが出来る。ここで使用される「ゲノム要素」という用語は、通常cDNAにはとり込まれずまたアデノウイルスゲノムの一部でもない自然発生遺伝子にあるヌクレオ

チドの配列を意味する。ベクターに含まれ得るこのようなゲノムは必ずしもそれに限定されないが、イントロン、凝固因子をコード化する遺伝子の5' 未翻訳領域、および3' 未翻訳領域、あるいはそのような5' および3' 未翻訳領域およびイントロンの一部分を含む。使用されるイントロンの例は、必ずしもそれに限

定されないが、因子IX遺伝子、あるいはその部分の7個のイントロンのいずれか（EMBO J.、9巻、10号、3295-3301ページ（1990年））；あるいは因子VIII遺伝子の25個のイントロンのいずれか（ギッシア、ネイチャー、312巻、326-330ページ（1984年））、もしくはその部分；あるいはアポリポタンパクA-1遺伝子の第1エキソンおよびイントロンを含む。

DNA配列が因子IXあるいはその断片、誘導体、もしくは類似体をコード化する時、ベクターは1実施例においては更に因子IX DNA配列の完全3'未翻訳領域を含む。も一つの実施例においては、ベクターは完全5'未翻訳領域および中心切形第1イントロンを更に含む。更に一つの実施例では、ベクターは因子IX遺伝子の完全第7イントロンを含むことが出来る。

このような要素がベクターに含まれる時、因子IXの発現の改善された水準が得られる。この発明の範囲はいずれかの理論的類推に限定する意図はないけれども、このような発現の改良は（i）ゲノム配列へのエンハンサーのとり込み、（i i）mRNAの安定化、（i i i）mRNAの細胞形質への加工および輸送の改良、およびもしくは（i v）改良されたポリアデニル配列の導入を含む。

（i i i）mRNAの細胞形質への加工および輸送の改良は、mRNAの5'末端のメチル化、によるものである。

も一つの実施例において、アポリポタンパクA-1遺伝子の第1エキソンおよび第1イントロンがもし望ましければアポリポタンパクA-1遺伝子プロモーターと共に使用することが出来る（全米科学アカデミー紀要、80巻、6147-6151ページ（1983年10月）；生物科学ジャーナル、266巻、27号、18045-18050ページ（1991年9月））。前記イントロンおよびもしくはエキソンは、更に凝固因子をコード化する遺伝子の5'未翻訳領域およびもしくは3'未翻訳領域と併用することが出来る。

一つの望ましい実施例において、アポリポタンパクA-1プロモーターは単独で、あるいは第1エキソンおよびもしくは第1イントロンと併用して、因子VIII遺伝子と併用して使用される。

使用されるアデノウイルスベクターは、1実施例において、基本的に完全なア

デノウイルスゲノムを含むアデノウイルスベクターである（シェンク他、Curr. Top. Microbiol. Immunol., 111巻、（3号）、1-39ページ（1984年））。代替的にアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの少くとも一部が欠失している修飾アデノウイルスベクターである。

望ましい実施例において、アデノウイルスベクターはアデノウイルス5' ITR、アデノウイルス3' ITR、アデノウイルス包膜シグナル、凝固因子をコード化する少くとも1個のDNA配列、および凝固因子をコード化する少くとも1

個のDNA配列を制御するプロモーターよりなる。このベクターは少くとも多数のアデノウイルスE1およびE3 DNA配列からは自由であるが、すべてのE2およびE4 DNA配列、更にアデノウイルス主要後期プロモーターにより促進されるアデノウイルスタンパク質をコード化するDNA配列から自由ではない。1実施例において、ベクターはE2およびE4 DNA配列よりなるグループから選択される少くとも1個のDNA配列の少くとも一部からは自由である。

も一つの実施例において、ベクターは少くとも多数のアデノウイルスE1およびE3 DNA配列から自由であり、またE2およびE4 DNA配列の一つから自由であり、更にE2およびE4 DNA配列以外のものの一部から自由である。

更にまたも一つの実施例では、72キロダルトン結合タンパク質をコード化するE2a領域にある遺伝子は、温度感受性タンパク質を生産するために突然変異され、それはウイルス粒子が生産される温度の32℃で活性であり、動物あるいはヒト宿主の温度である37℃では不活性となる。この温度感受性突然変異体は、エンシンジャー、他、ウイルス学ジャーナル、10巻、328-339ページ（1972年）、ヴァンダーヴリート、他、ウイルス学ジャーナル、15巻、348-354ページ（1975年）、およびフリーフェルド、他、ウイルス学、124巻、380-389ページ（1983年）に説明されている。

またも一つの実施例では、ベクターは少くとも多数のE1およびE3 DNA

配列から自由であり、E 2 および E 4 DNA 配列よりなるグループから選択される少なくとも 1 個の DNA 配列の少なくとも一部から自由であり、またアデノウイルス主要後期プロモーターにより促進されるアデノウイルスタンパク質をコード化する DNA 配列から自由である。

望ましい実施例においてこのようなベクターは、標準方法に従って一つのシャトルプラスミドを構築することによりまず構成され、このプラスミドは 5' 末端で開始し、「臨界左末端要素」を含み、それはアデノウイルス 5' ITR、アデノウイルス包膜シグナル、および E 1 a エンハンサー配列；（アデノウイルスプロモーターあるいは外来プロモーターでもよい）プロモーター；（前に記載した）多重クローニング部位；ポリ A シグナル、およびアデノウイルスゲノムの分接に対応する DNA 分接よりなる。このベクターは更に三部分リーダー配列を含む。アデノウイルスゲノムに対応する DNA 分接は修飾あるいは突然変異アデノウイルスを用いて相同的組換えの基質として利用することが出来、またこのような配列は、例えばゲノムの塩基 3/3/2/9 から塩基 6/2/4/6 までのものより短いアデノウイルス 5' ゲノムの分接を含む。プラスミドは更に選択マーカーおよび複製起点を含む。複製起点は細菌性複製起点であり得る。このようなシャトルプラスミドの例は図 10 で示される pAVS6 を含む。凝固因子をコード化する望ましい DNA 配列は次いでプラスミドベクターを生産するために多重クローニング部位に挿入される。

この構築は次いでアデノウイルスベクターの生産に使用される。相同的組換えは少なくとも多数の E 1 および E 3 アデノウイルス DNA 配列が欠失している修飾あるいは突然変異アデノウイルスを使って実行される。このような相同的組換えは、リン酸カルシウム ( $\text{CaPO}_4$ ) 沈殿により 2/9/3 細胞のようなヘルパー細胞にプラスミドベクターおよび修飾アデノウイルスを同時形質移入して実行することが出来る。このような相同的組換えに際し、組換えアデノウイルスベクターは、Not I 部位および相同的組換え断片の間でシャトルプラスミドから誘導される DNA 配列、および相同的組換え断片および 3' ITR の間の E 1 および E 3 欠失アデノウイルスから誘導される DNA を含むように形成される。

1 実施例において相同的組換え断片は、アデノウイルス5 (ATCC VR-5) ゲノムのヌクレオチド3329から6246でオーバーラップする。

このような相同的組換えを通じて、アデノウイルス5' ITR; アデノウイルス包膜シグナル; E1a エンハンサー配列; プロモーター; 凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列; ポリAシグナル; 少なくとも多数のE1およびE3 アデノウイルスDNA配列から自由であるアデノウイルスDNA; およびアデノウイルス3' ITRを含むベクターが形成される。ベクターは更に三部分リーダー配列を含む。このベクターは、E1a およびE1b DNA配列を含みウイルス複製に必要な293 ヘルパー細胞系のようなヘルパー細胞系に感染性アデノウイルス粒子を生成するために形質移入される。

1 実施例においては、アデノウイルスベクターは、アデノウイルス5' ITR; アデノウイルス3' ITR; アデノウイルス包膜シグナル; 凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列; および凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列を制御するプロモーターよりなる。このベクターはアデノウイルスE1, E2, E3 およびE4 DNA配列から自由であり、またベクターはアデノウイルス主要後期プロモーターにより促進されるアデノウイルスタンパク質をコード化するDNA配列から自由である。すなわちベクターはアデノウイルス構造タンパク質をコード化するDNAから自由である。

このようなベクターは標準方法によりアデノウイルスゲノムからアデノウイルス5' ITR, アデノウイルス3' ITR およびアデノウイルス包膜シグナルを除去して構築することが出来る。この成分、同じく (アデノウイルスプロモーターあるいは非アデノウイルスプロモーターである) プロモーター、三部分リーダー配列, ポリAシグナルおよび選択マーカーは、標準方法により、例えばpB1uescript II KS- (ストラタジェン社) などの塩基プラスミドあるいは「出発物 (スターター)」プラスミドに結合し、適切なクローニングベクターを形成することが出来る。クローニングベクターは、凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列のクローニングベクターへの挿入を容易にするために多重クローニング部位を含むことがある。一般に多重クローニング部位は「

「希有」制限酵素部位；すなわち10,000塩基対毎か

ら100,000塩基対毎に1回の頻度で真核細胞遺伝子に見出される部位を含む。この発明に従って適切なベクターはかくして多重クローニング部位の適切な制限部位で標準方法によりクローニングベクターを切断し、次いで凝固因子をコード化するDNA配列をクローニングベクターに結合することにより形成される。

ベクターは次いで必要な包膜材を提供するヘルパーアデノウイルスを用いて感染性非複製組換えアデノウイルス粒子内にパッケージされる。ヘルパーウイルスがそれ自身を包膜しないようにするため、ヘルパーウイルスが欠陥包膜シグナルを持つことが望ましい。採用される包膜欠陥ヘルパーウイルスの例は、グレーブル、他、ウイルス学ジャーナル、6.6巻、7.2.3-7.3.1ページ（1992年）に記載されている。

ベクターおよび包膜欠陥ヘルパーウイルスは感染性ウイルス粒子を生成するために適切な細胞系に形質移入される。形質移入は電気穿孔法、リン酸カルシウム沈澱、顕微注射により、あるいはプロテオリポソームを通じて行われる。適切な細胞系の例は、必ずしもそれに限定されないが、ヒーラ細胞あるいは293（胚腎臓上皮）細胞（ATCC NO. CRL 1573）を含む。感染性ウイルス粒子（すなわちアデノウイルスベクター）は次いで肝細胞などのような真核細胞に形質導入され、これにより凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列が宿主内での真核細胞により発現される。

感染性ではあるが複製欠陥ウイルス粒子よりなり、凝固因子をコード化する少なくとも1個のDNA配列を含むベクターは、宿主の血友病を治療するのに有効な量で投与される。1実施例において、ベクター粒子は1プラーク形成単位から約 $1 \times 10^{14}$ プラーク形成単位、望ましくは約 $1 \times 10^6$ プラーク形成単位から約 $1 \times 10^{13}$ プラーク形成単位の量で投与される。宿主はヒトあるいは非ヒト動物宿主である。望ましい非ヒト動物宿主は哺乳類であり、もっとも望ましいのはイヌあるいは非ヒト霊長類である。

望ましくは、感染性ベクター粒子は（例えば末梢静脈注射を経由するような）例えば静脈内投与のように全身投与され、あるいは筋肉内、腹腔内、もしくは鼻腔内で門静脈を経由して胆管に投与される。

ベクター粒子は患者に投与するのに適した薬理的許容担体と併用することが出来る。担体は液状担体（例えば食塩溶液）、あるいは例えばマイクロキャリアビードのような固形担体である。

前記記載の通り、ゲノム要素のアデノウイルスベクターへのとり込みが凝固因子をコード化するDNA配列の発現の向上を提供することを発明者は発見した。かくしてこの発明のも一つの見地に従って、異種タンパク質をコード化する少くとも1個のDNA配列、およびそのようなDNA配列の発現に影響を与える少くとも1個のゲノム要素を含むアデノウイルスベクターが提供される。「ゲノム要素」という用語は前に定義された通り使用される。このゲノム要素は必ずしもそれに限定されない

が、イントロン、5' 未翻訳領域、3' 未翻訳領域、前記イントロンおよび3' 更に5' 未翻訳領域の部分を含む。アデノウイルスベクターは前記記載の通りである。

異種タンパク質をコード化するDNA配列は、少くとも1個の治療剤をコード化するDNA配列である。「治療」という用語は包括的な意味で使用され、治療薬、予防薬、および置換剤を含む。

アデノウイルスベクターに入れられる治療剤をコード化するDNA配列は必ずしもそれに限定されないが、以下に記すものを含む。前記記載の因子VIIIおよび因子IXをコード化するDNA；TNF- $\alpha$ などのような腫瘍壊死因子（TNF）遺伝子をコード化するDNA配列；インターフェロン- $\alpha$ ，インターフェロン- $\beta$ およびインターフェロン- $\gamma$ などのインターフェロンをコード化する遺伝子；IL-1，IL-1 $\beta$ ，およびインターロイキン2から14などのようなインターロイキンをコード化する遺伝子；GM-CSFをコード化する遺伝子；アデノシンデアミナーゼすなわちADAをコード化する遺伝子；リンパ球の成長因子であるリンホカインなどのような細胞成長因子をコード化する遺伝子；可溶性CD4



をコード化する遺伝子；T細胞受容体；コレステロールの移送および代謝にかかわるLDL受容体，ApoE，ApoC，ApoA Iおよび他の遺伝子；アルファ-1アンチトリプシン（ $\alpha 1AT$ ）遺伝子；オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）遺伝子，CFTR遺伝子，インシュリン遺伝子，単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子，サイトメガロウイルスチミジンキナーゼ遺伝子，

ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子および水痘帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子などのようなウイルスチミジンキナーゼ遺伝子；抗体の抗原結合領域のFc受容体，およびB型肝炎あるいは非A非B型ウイルス肝炎の複製を阻害するアンチセンス配列などのようなウイルス複製を阻害するアンチセンス配列

DNA配列を調節するプロモーターは前記記載のものから選択することが出来る。

1実施例において、ゲノム要素および異種タンパク質をコード化するDNA配列は同じ内在性遺伝子の部分である。例えば、アデノウイルスベクターは因子IXおよび因子VIIIゲノム要素をコード化するDNAを含む。もう一つの実施例では、異種タンパク質およびゲノム要素をコード化するDNA配列は異なった内在性遺伝子から取られる。例えばアデノウイルスベクターは因子VIIIおよび因子IXゲノム要素をコード化するDNAを含む。

更にも一つの実施例において、アデノウイルスベクターが異種タンパク質および同じ内在性遺伝子からの少なくとも1個のゲノム要素をコード化するDNAを含むようにアデノウイルスベクターを構築することが出来る。異種タンパク質をコード化するDNAは、異種タンパク質をコード化するDNAに通常存在する少なくとも1個のエキソンが除去され、も一つの遺伝子に存在する1個もしくはそれ以上のエキソンにより代替されるように修飾される。

この発明の見地の範囲は何らの理論的推論により限定される

ものではないけれども、出願人が確信していることは、異種タンパク質をコード化する少なくとも1個のDNA配列を含むアデノウイルスベクター内に少なくとも1

個のゲノム要素を含有させることにより、誰でも内在性転写、RNA処理および異種タンパク質をコード化するDNA配列の翻訳に接近することが出来、それにより異種タンパク質の発現増加を提供出来るということである。

この発明は以下の実施例に関連してこれから説明される。しかし、この発明の範囲はそれに限定されるものではない。

### 実施例 1

#### 因子IX遺伝子を含むアデノウイルスベクターの構築

##### A. pG1H9の構築

プラスミド pG1 (1991年7月25日公告、PCT出願番号WO91/10728に記載) (図3) は、ミラー、他、バイオテクニク、7巻、980-990ページ (1989年) により pLNSX から構築された。プラスミド pG1 の構築戦略は図1で示される。5' モロニー肉腫ウイルス (MoMuSV) LTR を含む 1.6 キロベース EcoRI 断片、3' LTR、細菌複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子を含む 3.0 キロベース EcoRI/ClaI 断片が別個に分離された。7個のユニーククロニング部位を含むリンカーが、次いで EcoRI/ClaI 断片をそれ自身の上に閉じるために使用され、かくしてプラスミド pGO を生成した。プラスミド pGO は 5' LTR を含む 1.6 キロベース EcoRI 断片を pGO のユニーク EcoRI 部位に挿入することによ

り、ベクタープラスミド pG1 を生成するために使用された。かくして pG1 は、MoMuSV から誘導される 5' 部分、真正 ATG 出発コドンが TAG に突然変異している gag の短い部分 (ベンダー、他、ウイルス学ジャーナル、61巻、1639-1649ページ (1987年))、5' から 3' までに EcoRI、NotI、SnaBI、SalI、BamHI、HhoI、HindIII、ApaI、および ClaI 部位を含む 54 塩基対多重クロニング部位 (MCS)、および (ヴァン ピファレン、他、コールド スプリング ハーバー、2巻、567ページ、(1985年) に記載されているように) 塩基対 7764 から 7813 までの番号を付された MoMuLV の 3' 部分よりなる (図2)。MCS は pG1 プラスミド、neo<sup>r</sup> 遺伝子、β ガラクトシダーゼ遺伝子、およびヒ

グロマイシン<sup>®</sup>遺伝子、またSV40プロモーターの非切断制限酵素のスクリーンにもとづき最大数のユニーク挿入部位を生成するために設計された。

pG1 (図3) はBamHIおよびHindIIIで切断された。因子IX遺伝子、SV40プロモーター、およびneo<sup>®</sup>遺伝子を含むpLIXSN (パーマー、他、血液、73巻、2号、438-445ページ(1989年2月)) もまたBamHIおよびHindIIIで切断された。生成するBamHIおよびHindIII断片は因子IX遺伝子を含み、次いでBamHI-HindIII消化pG1と結合しpG1H9を生成した(図4)。因子IX遺伝子は更に米国特許番号4,799,474, 4,371号で開示された方法に従って得ること

も可能であった。

#### B. pG1H9Bの構築

第一A.T.Gで出発するヒト因子IX cDNAの5'部分が天然5'ヒト因子IX配列と同一であるようにpG1H9B (図6)が構築された。これはDNA配列に逆位があるためpG1H9の場合にはならない。

pG1H9Bは次のように構築された。まず、ヒト因子IXのcDNAクローンがヒト肝臓cDNAをPCR増幅し、次いでプラスミドpBlue-script SK- (ストラタジェン社、ラホーラ、カリフォルニア)にサブクローンすることにより生成された。生成プラスミドはphfacIXと名付けられた(図5)。このプラスミドの因子IX配列の5'末端は次いでG1H9にある因子IXの配列の5'末端と代替するために使用された。phfacIXは次いでBamHIおよびDraIで切断され、因子IX cDNAの5'末端に対応する334塩基対断片は分離された。pG1H9はDraIおよびClaIで切断され、因子IX cDNAの3'末端をコード化する1253塩基対断片は分離された。因子IX cDNAをコード化する2個の分離断片はpG1H9バックボーンに結合され、それはBamHIおよびClaIで切断され、pG1H9Bを生成した(図6)。

#### C. pAvS6の構築

アデノウイルス構築シャトルプラスミドpAvS6はクローニング技術にもと

づくポリメラーゼ連鎖反応を含む標準クローニング技術を用いるいくつかの段階で構築された。まず291

3塩基対 B g l I I, H i n d I I I断片はA d - d 1 3 2 7から除去され、平滑断片としてp B l u e s c r i p t I I K S - (ストラータジェン社、ラホーラ、カリフォルニア)のX h o I部位に挿入された(図7)。

A d - d 1 3 2 7は、アデノウイルス5ゲノムの塩基28591から30474(あるいは地図単位78.5から84.7)を含むX b a I断片でE3領域に位置するものが欠失していることを除けばアデノウイルス5と同一である。A d - d 1 3 2 7におけるE3欠失はA d - d 1 3 2 4におけるE3欠失と類似しており、後者はジンマパーヤ他、細胞、31巻、543ページ(1983年)に記載されている。完全アデノウイルスゲノムはジェンバンク アクセス番号M73260で登録されており、ここで参考文献としてとり込まれており、ウイルスはアメリカ合衆国、メリーランド、ロックヴィル、アメリカン タイプ カルチャー コレクションでアクセス番号VR-5で利用出来る。

A d - d 1 3 2 7はアデノウイルス5(A d 5)から従来の方法により構築された。この方法は下記の通り簡単に略述されており、これまでにジョーンズおよびシェンク、細胞、13巻、181-188ページ(1987年)で説明されている。A d 5 DNAはピリオン(ウイルス粒子)のタンパク質分解消化により分離され、X b a I制限エンドヌクレアーゼで部分的に切断される。X b a I断片は次いで断片の混合物として結合により再集合される。この結果、28591塩基対から30474塩基対の配列が除かれていることを除けばA d 5に

類似する一つの配列を持つある結合ゲノムを生成する。このDNAは次いで適当な細胞(例えばKB細胞、ヒーラ細胞、293細胞)に形質移入され、プラーク形成が出来るように軟寒天で重ねられる。個々のプラークは次いで分離され、増幅され、1878塩基対E3領域X b a I断片の不在を確認するためスクリーニングされる。

この断片の配向は、B g l I I部位がp B l u e s c r i p t I I K Sの

T7 RNAポリメラーゼ部位にもっとも近く、またHindIII部位がp Bluescript II KSのT3 RNAポリメラーゼ部位にもっとも近くなるようにされた。このプラスミドはpHRと名付けられた(図7)。

第2に、ITR、包膜シグナル、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、アデノウイルス三部分リーダー(TPL)配列および結合配列がPCR増幅を用いるブロックとして再集合された(図8)。ITRおよび包膜シグナル(ここで参考文献としてとり込まれたAd-d1327の配列1-392 [Ad5、ジェンバンク、アクセス番号73260からの配列と同一のもの])はNotIあるいはAscI制限部位を含むプライマーを用いてAd-d1327から一緒に増幅された(増幅1)。ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーターはAscI部位およびSfiI部位を含むプライマーを用いてプラスミドpRC/RSV(配列209から605; インバイトロジェン社、サンジエゴ、カリフォルニア)から増幅された(増幅2)。増幅1および2からのDNA産物はNotIプライマーおよび

SfiIプライマーだけで「オーバーラップ」PCR法を用いて結合された(増幅3) (ホートン、他、バイオテクニク、8巻、528-535ページ(1990年))。反応1および2からのそれぞれの初期DNA増幅産物のAscI含有末端の間で相補的にこれら2個の部分の結合が増幅中に行われた。次いでSfiIおよびXbaI部位をそれぞれ含有するプライマーを用いてAd-d1327で16時間感染された293細胞(ATCCアクセス番号CRL1573)から分離されたmRNAから作られたcDNAからTPLが増幅された(増幅4) (Ad-d1327の配列6049から9730 [Ad5、ジェンバンク、アクセス番号M73260からの類似の配列と同一のもの])。増幅反応3および4からのDNA断片は次いでNotIおよびXbaIプライマーでPCRを用いて結合され(増幅5)、かくして完全な遺伝子ブロックを生成した。

第3として、ITR包膜シグナルTPL断片は次いで精製され、NotIおよびXbaIで切断され、NotI、XbaI切断され、NotI、XbaI切断pHRプラスミドに挿入された。このプラスミドはpAvS6Aと名付けられ、その配向は断片のNotI部位がT7 RNAポリメラーゼ部位に隣接するもの

となった(図9)。

第4として、SV40初期ポリAシグナルはHpaI-BamHI断片としてSV40 DNAから除去され、T4 DNAポリメラーゼで処理されpAvS6を生成するためにプラスミドpAvS6A-(図9)のSalI部位に挿入された(図

9および図10)。

#### D. Av1H9Bの構築

完全タンパク質コーディング配列、5'未翻訳DNAの26塩基対(翻訳はメッセージの第3ATGで出発するものと仮定)、および3'未翻訳DNAの160塩基対を含む因子IXcDNA(図11)はC1aIで制限消化によりpG1H9Bから切除され、次いでクレノウを使って5'オーバーハングに注入され、更にSmaIで制限消化された。因子IXcDNAはまた米国特許番号4,994,371で開示された方法に従って得ることが出来た。

因子IXをコード化する断片は1.0%のアガロースゲル内での電気泳動に続き、電気溶出により分離された。この断片はpAvS6にサブクローンされ、FcoRVで線形化され子ウシ腸ホスファターゼで処理された。生成するシャトルプラスミドpAvS6H9B(図12)はアデノウイルスタイプ5(Ad5)の5'逆方向末端反復、Ad5の複製起点、Ad5包膜シグナルE1aエンハンサー、RSVプロモーター、Ad5の三部分リーダー配列、因子IXcDNA、SV40初期ポリAデニル化シグナルおよびヌクレオチド位置3329-6246からのAd5配列を含有する。

組換えアデノウイルスベクターAv1H9Bは図13で示されるように生成された。1.5×10<sup>6</sup>293細胞は60mm組織培養皿でAd-d1327の大型C1aI断片(Ad5のE3欠失突然変異体)4μgおよびNotIおよびKpnIで消化されたシャトルプラスミド5μgで同時形

質移入された。形質移入はBRLのトランスフィニティ(超限数)リン酸カルシウム形質移入システムを用いて行われた。形質移入の約15時間後に、DNA/

リン酸カルシウム沈殿物を含有する培地から除去され、細胞はPBSでゆるやかに洗浄され、次いで2X MEM (FBS 15%を補充されたG1BCOの2x修飾イーグル培地) およびシーブランク・アガロースの1:1混合物で覆われた。

プラークは無菌パスツールピペットを使ってとり出され、エッペンドルフ管の感染培地 (FBS 1%, 改良最少必要培地) 0.1 ml に移された。再懸濁プラークは3回の凍結融解サイクルを受け、次いでマイクロフュージ (微細物除去物) 内で全速での15秒間遠心分離により細胞デブリを清澄化された。

組換えアデノウイルスは以下の通り293細胞内で増幅された。皿当たり約 $5 \times 10^5$  293細胞が30 mm皿に接種された。翌日培地は細胞から除去され、感染培地0.2 ml および再懸濁プラーク0.1 ml で代替された。プレートは90分間37℃でCO<sub>2</sub> 5%の恒温器で軽くゆすりながら保温された。続いて完全培地 (FBS 10%, IMEM) 2 ml が加えられた。約40時間後細胞変性効果が明らかに現われた。細胞は集まり出し、プレートから離れ始めた。細胞と培地はプラスチック管に移され、凍結融解サイクルを4回受け、20,000 x gで5分間遠心分離された。生成された上澄みは粗ウイルス溶菌液 (CVL 1) として引用される。

ウイルスDNAは各CVL 1のアリコートから分離され、次いで以下に述べるようにPCRにより因子IXの存在を確認するために分析された。上澄みの6.0  $\mu$  l アリコートがエッペンドルフ管に移され80℃で5分間保温された。サンプルはマイクロフュージで5分間全速で遠心分離され、次いで上澄み5  $\mu$  l がPCR分析に使用された。PCR分析はパーキン・エルマー・シータス・ジーンアンプキットを用いて行われた。ヒト因子IX cDNAの異なった部分を増幅する2個の異なった対のプライマーが使用された。すべてのサンプルが期待された増幅帯を産出した。

## 実施例 2

### 実施例 1 のベクターの試験管内および生体内機能

因子IX cDNAを含有する組換えアデノウイルスベクターは、ヒト因子IXを

293細胞に発現する能力を検定された。約 $5 \times 10^5$  293細胞が60mm皿当たり接種された。翌日、培地は組換えアデノウイルス0.1mlおよび感染培地で代替された。プレートは37℃でCO<sub>2</sub> 5%内でゆっくりふりながら1時間保温され、次いで完全培地4mlが追加された。細胞は5回PBSでゆっくり洗浄され、次いで完全培地4mlが追加された。培地サンプルは24時間後に集められ、5分間1500 x gで遠心分離された。上澄みはエリザ（アッセラクロム1X:Agエリザキット, アメリカン バイオプロダクツ社）によりヒト因子IXを検定され、この水準は2個のサンプルで445および538 ng/mlであり、これは組換えアデノウイルスベクターがヒト因子IXを発現出来ることを示して

いた。非感染293細胞は因子IXのバックグラウンド水準を産出した。

1個の組換えアデノウイルスが大規模ウイルス調製のために選択された。約 $5 \times 10^6$  293細胞が15cm組織培養皿に接種された。翌日、培地は感染培地4mlおよび粗ウイルス株1mlで代替された。次いでプレートは37℃、CO<sub>2</sub> 5%で90分間ゆっくりふりながら保温され、続いて完全培地15mlが加えられた。約40時間後、細胞変性効果が明らかに見えた時、細胞および培地は50mlプラスチック管に移された。細胞は凍結融解5サイクルで溶離され、細胞デブリは5回1500 x gで遠心分離により除去された。上澄みはCVL2と名付けられた。

CVL2, 15mlが感染培地35mlで混合され、この混合物5mlが殆ど密集した293細胞の10個の15cmプレートそれぞれに加えられた。プレートは37℃、CO<sub>2</sub> 5%で1時間ゆっくりふりながら保温され、その後各プレートに完全培地15mlが加えられた。24時間後に細胞変性効果が観察された。細胞は丸くはなったが溶離はしなかった。細胞および培地は10分間2000 x gで遠心分離された。細胞ペレットは完全培地6mlで再懸濁された。細胞は凍結融解5サイクルで溶離され、その後SW40ローターで7000回転/分で10分間4℃で遠心分離された。上澄み内のウイルスは以下のようなCsCl段階勾配で精製された。TD緩衝液（トリス25mM, NaCl, 137mM,



KC1, 5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.7mM, pH7.5) 内でCsCl,

1.25g/ml, 3.0ml がウルトラクリア ベックマン#3.4/4.060超遠心管に置かれた。これはTD緩衝液のCsCl, 1.40g/mlの3.0mlで下敷きされた。CsCl層はウイルス上澄み4.5mlで上敷きされた。遠心分離は35,000回転/分、22℃で1時間SW40ローターで行われた。2個の帯が見え、上の帯は空カプシドよりなり、下の帯は無傷組換えアデノウイルスより構成されていた。

下の帯は3mlの注射器および21ゲージの針で集められ、次いで以下のように再帯化された。TD緩衝液内で1.33g/mlのCsCl, 9.0mlが超遠心管に置かれた。これは最初のスピンから集められたウイルスで上敷きされた。遠心分離は35,000回転/分、22℃、1.8時間行われた。乳白色帯が前記の通り集められ、グリセロールが最終濃度10%になるように加えられた。アデノウイルスが、トリスpH7.4, 10mM,  $\text{MgCl}_2$ , 1.0mMおよびグリセロール10%で構成される1リットルに対し4℃で透析された。透析は4時間行われ、緩衝液は1時間毎の間隔で3回取り替えられた。ウイルスは回収され、無菌エッペンドルフ管のアリコートに-70℃で貯蔵された。このウイルス調製の力価は $9.6 \times 10^8$  p.f.u./mlであった。

最初の生体内実験で、この組換えアデノウイルスA-v1H9Bは3匹のC57BL/6マウスに3種の異なった方法：肝臓への実質細胞内注射、門静脈内への注入、および尾静脈内への注入により注射された。

実質細胞内注射を受けた動物はメトフェンで麻酔された。長さ約7mmの経方向切開が剣状突起のすぐ下で行われた。中葉部および側葉部に突出が生じるように側腹部に圧力が加えられた。注射に際し、ウイルス( $1 \times 10^8$  p.f.u.)の0.1mlがハックス平衡食塩水(HBSS)で1.0mlに希釈された。ウイルスは肝臓の4個の異なった部位に注射された：0.25mlが中葉の半分それぞれに注射され、また左側葉の左側および右側に注射された。各注射は約1分にわたり行われた。針の除去に際し、注射部位にわたり小部分のゲルフォームを置く

ことで止血が行われた。2分後にゲルフォームはとり除かれ、肝臓は腹腔内にゆっくりと置かれ、皮膚切開はオートクリップで閉じられた。手術後数分内に動物は目覚め、1時間以内に歩行可能となった。

A d H 9 B の門静脈注入を受ける動物はメトフェンで麻酔された。正中線経方向切開が骨盤のすぐ上の剣状突起から行われた。腸は湿潤綿棒で動物の左外側にゆっくりと押し付けられた。ウイルス ( $1 \times 10^9$  p f u) の 0.1 ml アリコートが H B S S で 1.0 ml に希釈された。1 ml 注射器および 27 ゲージ針を使ってウイルス懸濁液が 30 秒にわたり門静脈に注入された。3 × 3 mm 片のゲルフォームが注射部位に置かれた。針が次いで抜かれた。湿潤綿棒を使って5分間ゲルフォームにゆるやかに圧を加えることで止血が行われた。ゲルフォームは適当に取り除かれた。腸はゆっくりと腹腔内に戻された。切開はオートクリップを使って閉じられた。動物は手術後 30 分以内に目覚め、1時間以内に歩行

可能となった。

A v 1 H 9 B の尾静脈注入は H B S S で 1.0 ml に希釈されたウイルス ( $1 \times 10^9$  p f u) の 0.1 ml を用いて行われた。ウイルス懸濁液は 27 ゲージの針を使って 10 秒にわたり注入された。

実質細胞内注射および門静脈注入を受ける動物は、ウイルスを受けない対照マウスと同様にウイルス受渡し 2 日後、6 日後および 9 日後に後方眼縁部叢 (r e t r o - o r b i t a l p l e x u s) を経て採血された。ヒト因子 IX のプラスマ水準はエリザで測定された。結果は図 14 で示される。

この点でマウスの肝臓のベクター水準を測定することが重要であった。従って実質細胞内注射および門静脈注入を受けた動物および負の対照マウスは注入 9 日後に犠牲にされ、更に尾注射を受けたマウスは注入 2 日後に犠牲にされた。各マウスの肝臓は除去され、かみそりの刃で広範囲に細分された。各肝臓の片半分は 15 ml 円すい型試験管に入れられ、溶離緩衝液 (トリス 10 mM, N a C l, 0.14 M, p H 7.6) 1.0 ml が加えられた。組織は 1 ml 注射器および 20 ゲージ針を用いて均質化された。次に、2 × P K 緩衝液 (トリス p H 7.5, 200 mM, E D T A 25 mM, N a C l, 300 mM, S D S 2 % (W /

V)、およびタンパク質分解酵素 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ )の $1.0\text{ml}$ が加えられた。試験管は数回逆さにされ、次いで $37^\circ\text{C}$ で一晩保温された。サンプルはフェノール/クロロホルム(1:1)で2回、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で1回抽出された。DNA

はエタノール沈殿され、エタノール70%で洗浄され、 $\text{pH}7.5$ のトリス $10\text{mM}$ 、EDTA、 $1\text{mM}$ で再懸濁された。

サザン分析が肝臓のベクター水準を計量するために実施された。各DNAサンプルの $10$ マイクログラムがBamHIで切断された。消化DNAサンプルはトリス $40\text{mM}$ 、酢酸ソーダ $20\text{mM}$ 、EDTA $1\text{mM}$ 、 $\text{pH}7.5$ 内で0.8%シーケムアガロースゲルの電気泳動を受けた。

電気泳動の後、ゲルは苛性ソーダ $0.2\text{N}$ 、NaCl $0.6\text{M}$ で1時間処理し、次いで $\text{pH}7.4$ トリス $1\text{M}$ 、NaCl $0.6\text{M}$ 30分間で中和された。DNAは $10\times\text{SSC}$ のプロッティングによりナイロン膜に移された。ナイロン膜は $80^\circ\text{C}$ で1時間真空オーブンで焼成される。それは3時間 $42^\circ\text{C}$ で $5\times$

デンハート溶液、 $5\times\text{SSC}$ 、 $\text{pH}6.5$ のリン酸ナトリウム $50\text{mM}$ 、サケ精子DNA $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 、SDS、0.1%、およびホルムアミド50%で前ハイブリッド形成された。膜は24時間 $42^\circ\text{C}$ で $1\times$ デンハート溶液、 $5\times\text{SSC}$ 、 $\text{pH}6.5$ のリン酸ナトリウム $20\text{mM}$ 、サケ精子DNA $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、SDS0.1%、ホルムアミド50%、およびランダムプライマー標識ヒト因子IXcDNA $33\mu\text{Ci}$ でランダム形成された。ランダムプライマー標識化はBRLキットで行われた。

膜は $2\times\text{SSC}$ 、SDS0.1%で20分間室温で洗浄され、次いで $2\times\text{SSC}$ 、SDS0.1%で50分間洗浄、次いで30分間 $0.1\times\text{SSC}$ 、SDS、0.1%で $68^\circ\text{C}$ で

洗浄された。膜はフィルムに16時間曝され、次いで現像された。オートラジオグラムのコピーが図15で示される。投与の三つのルートすべては同一の結果を示した。因子IXの帯は肝細胞当たり平均 $5-10$ コピーを示す強度を持つ適当なサ

イズであった。

### 実施例3

#### A v 1 H 9 B で注射されたマウスの因子IXの生体内発現

第2の大規模なA v 1 H 9 Bのウイルス調製が、28個の293細胞の15 cmプレートがウイルス増幅に使用されたことを除き前記の同じ実験記録を用いて行われた。この調製は最初のウイルス調製よりもより厚みのあるC s C 1勾配遠心分離に対するたんぱく光帯を産出した。このウイルス調製の力価は $1.1 \times 10^{11}$  p f u / m lであった。

発現の時間経過を追うように設計された第2の生体内実験は新しいA v 1 H 9 Bを用いて開始された。ウイルスは前記の通りマウスに投与されたが、但しウイルス懸濁液( $1 \times 10^{10}$  p f u) 0.1 m lが感染培地で1.0 m lまで希釈された。27匹のマウスが組換えアデノウイルスの注射を受けた。20匹のマウスは尾静脈注射を受け、内18匹はA v 1 H 9 Bまた2匹はA v 1 l a c Z 4 ( $\beta$ ガラクトシダーゼをコード化するもの)を受け、また他の4匹のマウスは肝臓の実質細胞内注射を受け、3匹は筋肉内注射を受けた。負の対照マウスは注射されなかった。ヒト因子IXのプラスマ水準は表1で示される。

表1で示されるように、I PはA v 1 H 9 Bの実質細胞内

注射を意味し、T VはA v 1 H 9 Bの尾静脈注射を意味し、I MはA v 1 H 9 Bの筋肉内注射を意味し、L a c ZはA v 1 l a c Z 4の尾静脈注射を意味し、またN Iは注射なし(対照)を意味する。

表 1

## プラズマ内での因子Ⅸの ng/ml

マウス	注射	1 週	2 週	3 週	4 週
1.	T V	376	475	281	171
2.	T V	270	500	392	336
3.	T V	229	374	...	...
4.	T V	240	...	...	...
5.	T V	362	...	...	...
6.	T V	346	...	...	...
7.	T V	303	422	252	142
8.	T V	260	573	394	220
9.	T V	353	376	273	149
10.	T V	321	357	270	246
11.	T V	431	482	233	203
12.	T V	347	332	...	...
13.	T V	135	244	126	61
14.	T V	261	294	187	148
15.	T V	212	269	132	91
16.	T V	207	255	214	176
17.	T V	278	218	151	149
18.	T V	170	308	...	...
19.	I M	0.9	3.0	0.0	0.0
20.	I M	1.0	2.7	0.0	0.0
21.	I M	1.1	2.6	1.0	1.2
22.	I P	364	316	174	131
23.	I P	211	308	134	66
24.	I P	305	252	155	206
25.	I P	527	406	133	94
26.	LacZ	0.0	2.8	1.5	0.4
27.	LacZ	0.0	2.6	2.0	1.2
28.	N I	0.0	2.6	1.5	0.5

マウス	注射	5 週	6 週	7 週
1 .	T V	98	34	16
2 .	T V	187	67	16
3 .	T V	...	...	...
4 .	T V	...	...	...
5 .	T V	...	...	...
6 .	T V	...	...	...
7 .	T V	...	...	...
8 .	T V	197	60	25
9 .	T V	131	90	46
1 0 .	T V	179	76	16
1 1 .	T V	...	...	...
1 2 .	T V	...	...	...
1 3 .	T V	84	62	17
1 4 .	T V	133	65	26
1 5 .	T V	94	64	33
1 6 .	T V	...	...	...
1 7 .	T V	92	57	23
1 8 .	T V	...	...	...
1 9 .	I M	0.0	2.0	0.0
2 0 .	I M	0.0	2.0	4.1
2 1 .	I M	0.1	2.0	0.0
2 2 .	I P	112	53	48
2 3 .	I P	42	28	19
2 4 .	I P	299	203	154
2 5 .	I P	57	21	13
2 6 .	LacZ	0.0	1.5	5.0
2 7 .	LacZ	0.0	1.5	4.0
2 8 .	N I	1.4	1.7	0.5

#### 実施例 4

##### ヒト因子IXの生物活性の検定

マウスプラスマ内のヒト因子IXの生物活性は免疫捕捉色素原検定を用いて測定された。96ウエルマイクロタイタプレートがヒト因子IXを認識するが不活性化しないエルカテク、インコーポレイテッドから得たBGIXIモノクローナル抗体で被

覆された。被覆は抗体の10 $\mu$ g/ml懸濁液を10 $\mu$ l各ウエルに加え、室温

で一晩保温することにより行われた。組換えアデノウイルス（1：5および1：1.0の希釈液100  $\mu$ l）で注射2週間後に実施例3でマウス7から得たプラスマサンプルがウエルに加えられ、ヒト因子IXは結合可能となった。ウエルは未結合材料を除去するために洗浄され、捕捉されたヒト因子IXは因子XIa（エンザイムリサーチラプス）の2  $\mu$ g/mlの100  $\mu$ lを加え、37℃で3.0分間保温することにより活性化された。ウエルは洗浄され、次いでリン脂質5.0  $\mu$ g（カピファーマシア社、フランクリン、オハイオ）、因子X 0.1単位（カピ）、因子VIII 0.5単位（エルカテク）、1-2581トロンビン阻害剤3.4  $\mu$ g（カピ）およびCaCl<sub>2</sub> 2.5 mMを含む混合物が加えられた。

プレートは37℃で30分間で保温され、その間に因子Xは因子Xaに転換された。N-N-アルファベンジルオキシカルボニル-D-アルギニル-L-グリシル-L-アルギニン-P-ニトロアニリド-ジヒドロクロライド、つまり色素原因子Xa基質0.5 mMの100  $\mu$ lが次いで加えられ、プレートは室温で10分間保温された。色の発展は5.0%酢酸50  $\mu$ lを加えることにより停止した。405 nmでの吸光度がバイオラッドマイクロプレートリーダーを用いて測定された。標準曲線（両対数および両線形）が正常プールヒトプラスマを使って生成され、5000 ng/mlの因子IX水準が想定された。生物活性因子IXは両対数法によれば511 ng/mlであり、両線形法によれば415 ng/mlであると測定された。

この結果は実験誤差の範囲内にあり基本的には実施例3（422 ng/ml）で測定された全因子IXのすべては生物活性であることを示すものである。

#### 実施例5

##### 因子VIII誘導体をコード化するDNAを含むアデノウイルスベクターの構築

pAVS6H81はpMT2LA（図16）およびpAVS6（図10）から構築された。pMT2LA（ジェネティックインスティテュート、ケンブリッジ、マサチューセッツ）は因子VIIIのB領域が欠失したヒト因子VIIIの誘導体をコード化するcDNAを含む。このようなDNAは更にトウル、他、ネイチャ、312巻、342-349ページ（1984年11月）、ヴィーハー、他、

ネイチャー、312巻、337-342ページ(1984年11月)、およびトゥール、他、全米科学アカデミー紀要、83巻、5939-5942ページ(1986年8月)に記載されている。このcDNAはラウス肉腫ウイルスプロモーターにより制御されている。4.6キロベースcDNA(図17)は天然5'未翻訳DNA、および3'未翻訳DNAの216塩基対を含んでいない。B領域欠失は全長因子VIIIのコーディング配列のヌクレオチド2334-4973を除去する。B領域欠失因子VIIIのcDNAは米国特許番号4,868,112で開示された方法に従って得ることも出来る。

cDNAはXhoIおよびSalIで制限消化によりプラスミドpMT2LAから切除された。末端はクレノウを使って

充填され、因子VIII誘導体をコード化する断片は0.8%アガロースゲルで分離され、続いて電気溶出された。この断片はpAVS6(図10)のEcoRI部位にサブクローンされ、pAVS6H81を生成した(図18)。

組換えアデノウイルスベクターAv1H81は図19で描かれるように生成される。1.5×10<sup>6</sup> 293細胞は60mm組織培養皿でAdd1327の大型C1aI断片4μgおよびNotIで消化したpAvS6H81 5μgを使って同時形質移入される。形質移入はBRLの超限数(トランスフィニティ)リン酸カルシウム形質移入システムを用いて行われる。形質移入の約15時間後に、DNA/リン酸カルシウム沈殿物を含む培地が皿から除去され、細胞はゆっくりとPBSで洗浄され、次いで2×MEMおよび2%シーブラークアガロースの混合物で上敷きされた。

組換えアデノウイルスはブラークから調製され、ヒト因子VIII cDNAの存在をPCRにより分析することが出来る。

### 実施例6

#### 因子VIIIプラスゲノム要素をコード化するDNAを含む

#### アデノウイルスベクターの生成

#### A. pAvALH81の構築

肝臓特異的転写因子結合部位(eG結合部位、リュー、他、分子細胞生物学、



11巻773-784ページ(1991年)およびディペルシオ、他、分子細胞生物学、11巻、4405-4414ページ(1991年)の3、5コピー

を含有するマウスアルブミンプロモーター(ザレット、他、全米科学アカデミー紀要、85巻、9076-9080ページ(1988年))が、5'オリゴとしてM1uI制御部位の追加でpAT2-3eGのnts4281-4299(ヌクレオチド)に相補的であるオリゴMGM8、293、

5'-GGC TAG ACG CGT GCT ATG ACC ATG ATT ACGAA-3'

および3'オリゴとしてBamHI、ClaI、およびSalI制限部位の追加でpAT2-3eGのnts5231-5212に相補的であるオリゴMGM5、293、

5'-GGT ACG GAT CCA TCG ATG TCG ACG CCG GAA AGG TGA TCT

GTGT-3'

を使用して、pAT2-3eGからPCR増幅された。このPCR産物はM1uIおよびBamHIで切断され、M1uIおよびBamHIで切断されたpAVS6(図10)に挿入されpAVAL1(図21)を生成した。964塩基対PCR生成アルブミンプロモーターの配列は配列決定で立証された。加えてpAVAL1(図21)にあるM1uI部位(nts428)およびBamHI部位(nts1392)のいずれか一つの側の少なくとも50塩基対が同じく配列決定により立証されている。プラスミドpAT-2-3eGはディペルシオ、他、分子細胞生物学、11巻、4405-4414ページ(1991年)およびザレット、他、全米科学アカデミー紀要、85巻、9076-9080ページ(1988年)で開示された方法に従って調製され、これは肝臓特異的転写因子結合部位の2個のコピーを用いたマウスアルブミンプロモ-

ーターの調製を開示する。プラスミドpAT2-3eGはブダペスト条約の下で20892、メリーランド、ロックヴィル、パークローン・ドライブ1230のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されており、割当てられた

アクセス番号は69603である。

I T R, 包膜シグナル (p A V S 6 の構築参照)、およびアルブミンプロモーターはN o t I (末端はT 4 DNAポリメラーゼで充填された) およびS a l I の消化でp A V A L 1 から除去され、p G E M (s a c) (図22) に挿入され、S a l I およびS m a I で切断されp G E M a l b (図24) を生成した (p G E M (s a c) はS a c I でp G E M (図23、プロメガ社) を切断し、T 4 DNAポリメラーゼおよび再結合で末端を平滑化し、これによりS a c I 部位を除去した)。B領域欠失因子VIII cDNAの5' 領域を含有する1914塩基対断片はB a m H I (5' 末端をT 4 DNAポリメラーゼで充填) の消化およびX h o I の消化によりp M T 2 L A (図16) から分離され、H i n d I I I (T 4 DNAポリメラーゼで充填) およびS a l I の消化によりp G E M a l b に挿入され、p G E M a l b F 8 B (図25) を生成した。p G E M a l b F 8 B はM l u I およびS p e I で切断され、生成する1556塩基対断片はp A v S 6 H 8 1 (図18) に挿入され、M l u I およびS p e I で切断され、アデノウイルス シャトルプラスミドp A v A L H 8 1 (図26) を生成した。M l u I 部位 (n t 429) およびS p e I 部位 (n t 1985) のいずれかの側の少くとも50

塩基対がA v 1 A L H 8 1 ウイルスDNA (以下参照) の配列決定により立証されている。因子VIII B領域欠失cDNAの配列がジェネティクス インスティテュートから得られたもののプラスミド、p M T 2 L A (図16) からの塩基1075から5732までの配列決定により立証されている。この配列はジェネティクス インスティテュートにより2個の塩基として報告された配列とは異なる。1個の塩基変更、p M T 2 L A のn t 1317はジェネティクス インスティテュートによりTであると報告され(トウール、他、ネイチャー、312巻、342-347ページ(1984年)) またウッド、他、ネイチャー、312巻、330-337ページ(1984年)) ではAである、と報告された。加えて、ジェネティクス インスティテュートによりTであると報告されたp M T 2 L A のn t 5721は削除され、かくして因子VIII 3' 末翻訳領域内にB a m H

I 部位を創り出した。この突然変異は因子VIIIコーディング領域を変えるものではない。

#### B. pAvAPH81の構築

1913塩基対断片はBamHIでの消化によりpAVS6H81(図18)から分離され、pGEM(sac)(図22)に挿入され、BamHIで切断されpGemF8B2(図27)を生成した。ATGCジェンバンク#X07496に対するApoA1プロモーター、第1エクソン(未翻訳)、第1イントロンおよび第2エクソンはpBGS19-AIgi(図28)を鋳型として使用しPCR増幅された。pBGS19-AIgi(図28)は2段階で構築された: 1) 13

キロベースSalI断片がラムダA1-103から除去され(スワンソン、他、形質転換研究、1巻、142-147ページ(1992年))、pUC19(図29、ジブコBRL)に挿入され、pUC-AIgiを生成した(図30)。2) 2キロベースSmaI断片がpUC19-AIgiから分離され(図30)、pBGS19に挿入され(図31)、pBGS19-AIgiを生成した(図28)。pBGS19(ATCC No. 37437)はpUC19のカナマイシン類似体である。pBGS19-AIgiのPCR増幅は5'オリゴとしてXbaIおよびMluI部位を含有するpBGS19-AIgiの塩基5862から16に相補的であるオリゴSSC1..593;

5'-GCT CTA GAA CGC GTC GGT ACC CGG GAG ACC TGC AAGCC-3'

およびヒト因子VIII(ジェンバンク #K01740)、(SacI部位に対するnts151-165、およびpBGS19-AIgiのnts463-487に相補的であり、SacIおよびEcoRI部位の追加でApoA1遺伝子(ジェンバンク #X07496)に対し相補的である3'オリゴSSC2..593,

5'-GGA ATT CGA GCT CTAT TTG CAT CCT GAA GGG CCG TGG GGA  
CCT GG-3'

を用いて行われた。このPCR断片はXbaIおよびSacIで消化され生成す

る509塩基対断片はXbaI-SacIで消化されるpGemF8B2 (図27) に挿入されpGemAPF8Bを生成した。pGemAPF8Bは次いでMluI-

SpeIで消化され、生成する1084塩基対断片はMluIおよびSpeIで切断されるpAVS6H81 (図18) に結合され、シャトルプラスミドpAvAPH81 (図33) を生成した。PCR創出ApoA1プロモーター領域およびすべてのクローニング結合を含むnts290から1619までのpAvAPH81の配列は立証された。

#### C. pAvALAPH81の構築

EcoRIおよびSalI部位、および3'オリゴ, SS2. 593 (前記参照) の追加によりApoA1遺伝子 (ジェンバンク#X07496) およびpBGS19-A1g1 (図28) のnts252-274に相補的である5'オリゴSSC3. 593,

5'-GAA TTC GTC GAC AGA GAC TGC GAG AAG GAG GTG CG-3'

を用いるpGemAPF8B (図32) のPCR増幅により、SalI部位がApoA1転写開始部位から上流に加えられた。PCR断面はSalI-SacIで消化され、生じる250塩基対断片はSalI-SacIで切断されるpGemF8B2 (図27) に挿入されpGemAPexF8B (図34) を生成した。プラスミドpALAPF-8B (図35) は、pGEMa1b (図24) から分離される953塩基対MluI-SalI断片、pGemAPexF8B (図34) から分離される825塩基対SalI-SpeI断片、MluI-SpeIで切断されたpGemAPF8B (図32) への挿入という三方向結合で生成された。1778塩基対MluI-SpeI断片は、pALAPF8B (図35) か

ら分離され、pAVS6H81に挿入され、シャトルプラスミドpAvALAPH-81 (図36) を生成した。

#### D. 組換えアデノウイルスベクターの生成

組換えアデノウイルスベクターAv1ALH81は図3.7で略述されるように生成された。 $2 \times 10^6$  293細胞はAd-d1327の大型C1a1断片 $10 \mu\text{g}$ および未消化シャトルプラスミドpAvALH81 (図2.6)  $10 \mu\text{g}$ を用いて $10.0 \text{ mm}$ 組織培養皿で同時形質移入された。形質移入はBRLの超限数リン酸カルシウム形質移入システムを用いて行われた。DNA追加約12時間後に細胞は $1 \times \text{PBS}$ の $2 \times$ で洗浄され、次いで $2 \times \text{MEM}$  (15% FBSを補充したGIBCO社の $2 \times$ 修飾イーグル培地) および2%シーブラークアガロースの1:1混合物で上敷きされた。

ブラークは無菌パスツールピペットで収穫され、エッペンドルフ管の感染培地 (改良最少必要培地 [IMEM], FBS 2%) の $0.1 \text{ ml}$ に移され、また凍結融解サイクル3回を受けた。細胞デブリはマイクロフュージ内で、全速15秒の遠心分離により除去された。

ブラークは以下に述べるような形で組換えアデノウイルスの存在を確認するためスクリーンされた。約 $5 \times 10^5$  293細胞が6個のウェル組織培養皿の各ウェルに接種された。翌日、培地は細胞から除去され、感染培地 $0.4 \text{ ml}$ および再懸濁ブラーク $0.05 \text{ ml}$ で取り替えられた。プレートは $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  5%保温器で90分間振動させながら保温され、その後完全培地 (IMEM, FBS 10%)  $2 \text{ ml}$ が加え

られた。細胞変性効果 (CPE) が完成し、細胞が丸くなりプレートから分離するようになった時 (感染後約40-120時間)、細胞および培地は $15 \text{ ml}$ 円錐試験管に移され、 $1000$ 回転/分、5分間遠心分離され、ペレット細胞にされた。培地は細胞ペレットから除去され、細胞は以下に述べるように処理された。

細胞はPK緩衝液 (pH 8.0のトリス $5 \text{ mM}$ , pH 8.0のEDTA $5 \text{ mM}$  およびSDS 0.5%)  $250 \mu\text{l}$ プラス プロテイナーゼK ( $1 \text{ mg/ml}$ )  $250 \mu\text{l}$ 内で再懸濁され、 $37^\circ\text{C}$ で4時間あるいは一晩保温された。この溶液はエッペンドルフ管に移され、フェノール $1 \times$ , フェノール- $\text{CHCl}_3$ ,  $1 \times$  および $\text{CHCl}_3$ ,  $1 \times$ の等量を用いて抽出され、エタノール沈殿された。ペ

レットはTE緩衝液 (pH 8.0 のトリス 10 mM, pH 8.0 の EDTA 1 mM) 50  $\mu$ l で再懸濁され、ゲノムDNAは制限消化で分析された。1個のプラークが期待通りの産物を産出した。

このAv1ALH81プラークは次の通り精製されたプラークであった。ウエル当り  $5 \times 10^5$  293細胞が6個の組織培養プレートで平板培養された。翌日、培地は細胞から除去され、再懸濁プラークの3種の異なった量、25  $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l および 0.25  $\mu$ l を含む感染培地 0.4 ml が各ウエルに加えられた。プレートは1時間半 37°C / CO<sub>2</sub> 5% 保温器で振動され、その後培地は除去され、ウエルは前記の通り 2X MEM および シープラーク アガロース 2% の 1:1 混合物で上敷きされた。プラークは感染の9日後にすべ

てのウエルで可視となった。いくつかのプラークが最低の希釈ウエル (再懸濁プラークの 0.25  $\mu$ l) から取り出され、前記の通り Av1ALH81 の存在を確認するためにスクリーンされた。すべてのプラークが予期されたウイルスを産出した。

1個のプラーク-精製プラークが大規模ウイルス調製のために選択された。  $5 \times 10^5$  細胞が6個のウエルプレートの各ウエルに平板培養され、翌日、前記の再懸濁プラーク-精製プラーク 50  $\mu$ l で感染された。感染5日後にCPEは完成され、細胞および培地は15 ml 円錐試験管に移され4回凍結融解サイクルを受け、次いで1000回転/分、5分間の遠心分離により細胞デブリが清澄化された。生じた上澄みは粗ウイルス溶菌液 #1 (CVL-1) として引用される。このCVLは以下に述べる約  $2 \times 10^7$  293細胞を含有する150 mmプレートを感染させるために使用された。

培地は感染培地 1.25 ml プラス CVL 100  $\mu$ l で取り替えられ、プレートは1時間半前記の通り振動され、その後完全培地 20 ml が加えられた。感染約20時間後、CPEは完成され、細胞および培地は50 ml 円錐試験管に移され、5分間1000回転/分で回転され、上澄みが除去および取り置かれ、また細胞ペレットは上澄み 5 ml で再懸濁された。4回の凍結融解サイクルの後、CVLは前記の通り細胞デブリを除去された。生じる上澄みはCVL-2として

引用される。293細胞の3.0-8.0%密集150mmプレートは以下に述べるようにCVL-2を使用して感染された。

CVL-2 600  $\mu$ lが感染培地38mlに加えられ、培地はプレートから除去されCVL-2感染培地混合物1.25mlで取り替えられた。プレートは前記の通り1時間半振動され、その後完全培地20mlが各ウェルに加えられた。30時間後CPEは完成され細胞は次に述べるように処理された。細胞および培地は250mlの遠心分離ボトルに収穫され1500回転/分で10分間回転された。細胞ペレットは上澄み2.0mlに再懸濁された。細胞は5回凍結融解サイクルで溶離され、次いでSWローターで7000回転/分で10分間遠心分離された。上澄み内のウイルスは次のようなCsCl階段勾配で精製された。

TD緩衝液(トリス25mM, NaCl 137mM, KCl 5mM, pH 7.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7mM)内でCsCl 1.25g/mlの3.0mlがウルトラクリアベックマン#344060超遠心分離管4個の中に入れられた。TD緩衝液内CsCl 1.4g/mlの3.0mlが次いで下敷きされた。CsCl層はウイルス上澄み5.0mlで上敷きされた。35,000回転/分22℃で1時間SW40ローターで遠心分離が行われた。2個の帯が可視となり、上部帯は空カプシドであり、下部帯は無傷組換えアデノウイルスよりなる。

下部帯は3ml注射器および18ゲージ針で集められ、次いでTD緩衝液内1.33g/ml CsClの8.0mlを2個の超遠心管に入れることにより再帯化され、最初の回転から採取されたウイルスで上敷きされた。遠心分離は35,000

回転/分22℃で18時間行われた。ウイルス帯は前記の通り採取され、グリセロールが最終濃度10%になるように加えられた。ウイルスはpH7.4のトリス10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mMおよびグリセロール10%の1リットルに対し4℃で透析された。透析は毎時間緩衝液を取り替え4時間続いた。ウイルスは回収され、無菌エッペンドルフ管のアリコートで-70℃で貯蔵された。このウイルス調製(ロット#MS1-1)の力価は $1.5 \times 10^{11}$  pfu/mlであっ

た。第2のAv1ALH81ウイルス調製は前記と類似の方法で行われ、再びCVL-2の600 $\mu$ lおよび80%密集293細胞の30-150mmプレートが使用された。第2の調製（ロット#MS1-2）の力価は $9 \times 10^{10}$  pfu/mlであった。

この段階でウイルスDNAは欠失あるいは再配列を照合された。因子VIII cDNA配列を含有するレトロウイルスベクターを利用する研究が高頻度で因子VIII cDNAの部分に欠失させ、およびもしくは再配列させることを示しており（リンチ、他、1993年）、また類似の再配列が因子VIII含有アデノウイルスベクターで見ることが出来る。従って、ウイルスDNAは以下に述べるようにAv1ALH81の両方のロット（MS1-1およびMS1-2）から分離された。精製ウイルス100 $\mu$ lがTE100 $\mu$ l、SDS10%の5 $\mu$ lおよびプロテイナーゼK（シグマ社）10mg/mlの20 $\mu$ lに加えられ、37℃で一晩消化された。ウイルスDNAは等量のフェノール1X、フェノール-CHCl<sub>3</sub>、1Xおよび

CHCl<sub>3</sub>、1Xで抽出され、次いで上澄みはセントリコン10濃縮器（エモコン社）にかけられ、その量がTEの追加で2mlに増加し、5000回転/分で1時間回転された。セントリコンは次いでTE2mlで洗浄され、30分間、5000回転/分で回転された。DNAはセントリコンの上部チャンバを逆転させ、収集管に挿入し、3000回転/分で5分間遠心分離して回収された。精製DNAの最終量は100 $\mu$ lに増加し、DNA濃度が計算された。MS1-1、MS1-2およびd1327DNAの10 $\mu$ gがBamHI、HindIIIあるいはNdeIで一晩消化され、0.8%アガロースゲル上で流された。DNA断片は臭化エチジウム染色で視覚化された（図38）。Av1ALH81の両ロットは同じのように見え、またすべての制限断片は予測サイズのものであった。従って因子VIII含有レトロウイルスベクター（リンチ、他、1993年）とは異なり、Av1ALH81のゲノムは安定である。

組換えアデノウイルスベクターAv1ALAPH81は図39で概略されている通り生成された。2 $\times 10^6$  293細胞は未消化シャトルプラスミド、pA



v ALAPH81 (図36) の  $1.0 \mu\text{g}$  で  $1.00 \text{ mm}$  組織培養皿で同時形質移入された。アデノウイルスベクター Av1ALAPH81 の生成は次いでアデノウイルスベクター Av1ALH81 と同じ方法で実施された。Av1APH81 は同じ方法で生成出来る。

### 実施例7

#### 因子VIIIプラスゲノム要素をコード化するDNAを含むアデ

#### ノウイルスベクターの生体内発現

##### A. 因子VIII三重サンドイッチ・エリザ

マウス生体内、あるいは組織培養細胞として試験管内で因子VIII発現を Av1ALH81 が検定される前に、マウスプラスマに存在するヒト因子VIIIの低い水準を測定することの出来る検定を開発する必要がある。ただ一つ商業的に利用出来る因子VIII検定法、コーテスト (Coatest, カピファーマシューティカルズ社) は因子VIIIタンパク質の生物活性を測定し、組織培養細胞にある因子VIII水準を測定するのに使用することが出来る。しかしコーテストはヒト因子VIIIを動物因子VIIIと区別することが出来ず、従って動物プラスマにあるヒト因子VIIIを測定するためには有用ではない。組織培養培地あるいは動物プラスマに存在するヒト因子VIIIの量を測定するために、定量因子VIII三重サンドイッチ・エリザが開発された。このエリザはとりわけマウスおよびイヌにあるヒト因子VIIIを測定することが出来、また因子VIII濃度を下方  $1.0 \text{ ng/ml}$  まで再生的に測定することが出来る。この検定は次のように行われる。

96 ウエル マイクロタイタプレートが、因子VIIIタンパク質のユニークエピトープと共に2種の商業的に利用出来るモノクローナル抗体で被覆され、一晩  $4^\circ\text{C}$  で保温され、プラスチックウエルへの接着を可能にする。各抗体 (N7、バイオデザイン社; およびESH2、アメリカンダイアグノスティカ社) の

の  $0.5 \mu\text{g}$  が希釈緩衝液 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $1.59 \text{ g}$ ,  $\text{NaHCO}_3$   $2.93 \text{ g}$ , 無菌水1リットル, pH9.6) に希釈され、この希釈液の  $10 \mu\text{l}$  が各ウエルに加えられた。これらの抗体は一次抗体を構成する。検定の感受性を増加さ

せるために協力して作用する2種の捕捉抗体の使用はこれまでに説明されたことはない。一般の保温の後、ウエル当り $200\mu\text{l}$ の1X PBSの3Xでゆるやかに洗浄され、乾燥点染された。遮断薬[PBS 1X, ウマ血清(熱不活性、バイオウィタッカー社) 10%、および $\text{CaCl}_2$  1mm]が加えられ、2時間室温で保温され、その後プレートはウエル当り $200\mu\text{l}$ の洗浄剤[PBS 1X, トウィーン20(シグマ社)] 3Xで洗浄され、乾燥点染される。サンプルは次いでTNTC(pH7.2 トリス50mm,  $\text{CaCl}_2$  5mm, トウィーン20 0.1%,  $\text{NaCl}$  0.5M)で適当に(通常5倍溶液で)希釈され、ウエルはアリコートされ、1時間37℃で保温され、その後ウエルは前記の洗浄剤で洗浄される。因子VIII阻害体抗体を含有する血友病者から得た希釈血清である二次抗体(遮断薬溶液の1:1000希釈)が加えられ、1時間37℃で結合が可能となり、その後ウエルは前記の洗浄剤で洗浄される。第3の抗体、つまりホースラディッシュペルオキシダーゼに共役する商業的に利用可能な山羊抗ヒトIgG抗体(ヤギ抗ヒトIgG-HRP, ピアス,  $0.8\text{mg/ml}$ , 1:5000で遮断薬で希釈、ウエル当り $100\mu\text{l}$ )が加えられ、1時間37℃で保温される。過剰抗体は次いでウエルから洗浄で除かれ(前記の通り、但し

5X)、HRPにより切断される時に青色を産出する基質テトラメチルベンジジン(TMB)(キルケガード アンド ペリー ラブズ; 商業的に利用可能な溶液 $100\mu\text{l}$ )が各ウエルに加えられる。展開する色の量はサンプル内に存在する因子VIIIの量に比例する。酸停止溶液(TBM停止溶液、キルケガード アンド ペリー ラブズ, ウエル当り $100\mu\text{l}$ )を用いて2-3分後に反応は停止し、吸光度はマイクロタイタプレートリーダーを使って測定される。典型的な標準曲線が $0.078\text{ng/ml}$ から $40.00\text{ng/ml}$ にわたる全長ヒト因子VIIIタンパク質濃度を用いて図40で示される。

#### B. マウスプラスマ内のB領域欠失因子VIIIの半減期研究

この感受性のきわめて高い因子VIIIエリザの開発後、マウスプラスマ内のB領域欠失(BDD)因子VIIIの半減期研究がとり上げられた。ヒトおよびイヌの全長ヒト因子VIIIの半減期が10乃至12時間(ブリンクハウス、他、全米科学ア

カデミー紀要、82巻、8752-8756ページ(1985年)であるのに  
対し、マウス内でのヒト因子VIIIの半減期は1時間に過ぎないとの報告があった  
(ヘーベン、他、1993年)。マウス内のBDDヒト因子VIIIの半減期の測定  
はそれに続くマウスを生体内モデルとして利用する遺伝子実験記録に対するAv  
1ALH81の効能評価にとって重要であった。

半減期の研究は2回行われた。最初の実験(図4.1)では5匹のC57b1/  
6メスのマウスが尾静脈からBDD因子VIIIタンパク質400 ngを注射された  
。注射後0.5, 1.5, 2.5および6.5時間後に血液が抜き取られた。第  
2の実験

では注射後2乃至14時間後の時間帯に焦点がしぼられ、4匹のC57b1/6  
メスマウスがBDD因子VIII 500 ngを尾静脈から注射された。血液は注射  
後2, 5, 8, 12および14時間目に抜き取られ、プラズマはヒト因子VIII抗  
原の存在を確認するために分析された。この結果は図4.1および4.2で示される  
。マウス内のヒト因子VIIIの半減期は4-5時間であると計算された。この結果  
はヘーベン他(1993年)により計算された半減期と対照的である。しかしヘ  
ーベン他による研究(1993年)において、マウス内での因子VIIIの半減期は  
ほんの2時間だけ分析されたに過ぎなかった。ここで報告される研究では、注射  
後30分から2時間までの間でマウスプラズマ内での因子VIII抗原の水準に急激  
な減少(半減期1.7時間)が見出され(図4.1)続く時点で4-5時間の半減  
期に減少度が低下して横ばい状態となった(図4.1および4.2)。従ってマウス  
におけるヒトBDD因子VIIIの半減期はヒトおよびイヌにおけるヒト因子VIIIよ  
りも約2-3倍短いということをこの結果は示している。

### C. 試験管内での生物活性因子VIIIの生産

生物活性因子VIIIの試験管内での生産でAv1ALH81の形質導入が生じた  
かどうかを測定するために、以下に述べるようにブラーク精製Av1ALH81  
の2個の異なるブラークから生成される293細胞がCVL-1で感染された。  
培地は $1.5 \times 10^7$ 細胞を含有する293細胞の3-150 mmプレートから  
除去され、感染培地1.15 ml プラスいずれかのAvALH81ブラーク(ブ

ラーク1あるいはプラーク2)

からのCVL-1 100 $\mu$ l、もしくは負の対照プレートとして感染培地1.25mlで取り替えられた。プレートは前記の通り1.5時間振動され、その後完全培地20mlが各プレートに加えられた。培地の1.0mlが各プレートから0, 12および24時間の時点で収穫され、前記のヒト因子VIII特異的エリザを用いて因子VIII抗原の存在を分析され、コーテスト検定(カピ ファーマシューティカルズ)を用いて生物活性を分析された。この結果は下記の表IIで示される。

表 II

Av1ALH81 形質導入 293 細胞における 因子 VIII の 発 現

検 定

<u>ウイルス</u>	<u>時 (時間)</u>	<u>エリザ (ng/ml)</u>	<u>コーテスト (ng/ml) *</u>
		<u>全 抗 原</u>	<u>生 物 活 性</u>
Av1ALH81	0	0.0	0.0
プラーク 1	12	9.8	6.9
	24	10.2	1.0
Av1ALH81	0	0.0	0.0
プラーク 2	12	22.1	7.6
	24	24.3	0.0
プラーク無し	0	0.0	0.0
	12	0.0	0.0
	24	0.0	0.0

\* 活性の1単位が因子VIIIの200ng/mlに等しい単位から変換したもの。

表IIで示されるように、細胞はエリザで測定されたように因子VIII全抗原10-20ng/mlを生産し、また12時間の時点で、因子VIIIの7ng/mlが生物活性であった。しかし24

時間後にはこの生物活性は失われた。12時間後の生物活性因子VIIIの低い水準

および24時間後の活性因子VIIIの欠如は、12時間で開始24時間で完成する細胞変性効果を細胞が受けているという事実により説明することで出来る。従って因子VIIIの新規合成は多分12時間で減少を開始し、培地に存在する因子VIIIは24時間までに分解した。

#### D. Av1ALH81からのBDD因子VIIIの生体内発現

ヒトBDD因子VIIIがAv1ALH81から生体内で発現されたかどうかを測定し、もしそうであるなら、因子VIII発現の時間経過を追って行くために、15匹のC57b1/6メスマウスがAv1ALH81で注射された。ウイルスは注射媒体(IMEM+ FBS1%)で全体の量が0.5mlになるように希釈された。5匹のマウスが $1 \times 10^{10}$  p.f.u (ウイルス $67 \mu\text{l}$ ;  $1.5 \times 10^{11}$  p.f.u/mlの濃度)の用量を受け、5匹のマウスは $4 \times 10^9$  p.f.u (ウイルス $27 \mu\text{l}$ )の用量を受け、また5匹のマウスは $1 \times 10^9$  p.f.u (ウイルス $7 \mu\text{l}$ )を受けた。ウイルス懸濁液は0.5ml注射器および27ゲージ針を用いて10秒間で尾静脈経由で注入された。対照マウスは注射を受けなかった。1匹のマウスはAv1ALH81  $1 \times 10^{10}$  p.f.uを受けたが注射2日後に死んだ。血液が1週間間隔で抜き取られ、エリザによりヒト因子VIIIの存在確認のため分析された。注射後最初の5週間の分析結果が下記表IIIで示され、図43でグラフで示される。

表Ⅲ

## 因子Ⅷの生体内発現

マウス	ウイルス用量	エリザ (因子Ⅷ ng/ml)				
		1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
1	$1 \times 10^{10}$	53.3	19.3	0.0	4.3	0.0
2	$1 \times 10^{10}$	45.9	54.6	0.0	34.3	0.0
3	$1 \times 10^{10}$	34.5	35.3	3.0	2.6	0.0
4	$1 \times 10^{10}$	33.1	31.1	10.9	7.7	1.8
平均値	—	41.7	35.1	3.5	12.2	0.5
5	$4 \times 10^9$	18.9	7.3	0.0	14.9	1.1
6	$4 \times 10^9$	13.0	6.2	5.1	7.9	3.1
7	$4 \times 10^9$	9.8	5.2	3.1	12.4	5.1
8	$4 \times 10^9$	25.9	13.1	3.4	18.4	12.9
9	$4 \times 10^9$	17.1	5.9	0.5	9.7	6.0
平均値	—	16.9	7.5	2.3	12.6	5.6
10	$1 \times 10^9$	0.8	0.0	0.0	3.6	0.8
11	$1 \times 10^9$	0.4	0.0	0.5	5.1	0.3
12	$1 \times 10^9$	1.1	1.6	2.2	4.2	2.5
13	$1 \times 10^9$	1.0	1.7	0.0	1.7	1.3
14	$1 \times 10^9$	1.4	0.9	0.0	1.9	0.0
平均値	—	0.9	0.9	0.5	3.3	1.0
対 照	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ウイルス最大容量 ( $1 \times 10^{10}$  p f u) を受けたマウスは注射1週および2週後、それぞれヒトBDD因子Ⅷを42および35 ng/ml産出した。もしもこれらの値がマウス内のヒト因子Ⅷの半減期 (4-5時間、前記参照) をヒトの場合 (10-12時間) と比較して差異を修正する場合には、プラスマの水準は1週および2週において因子Ⅷがそれぞれ126および96 ng/mlに調節される。ヒトの因子Ⅷ

の生理水準は100-200 ng/mlであり、治療水準は $\sim 10$  ng/mlとなる。従ってこれらのマウスは因子Ⅷの生理水準を産出していることになる。

しかし注射の3週から5週間後、因子VIIIの水準は大幅に低下した。3週で因子VIIIの減少が因子VIII抗原に対する免疫応答によるものかどうかを測定するために、第2の半減期研究が全長ヒト因子VIIIタンパク質を用いて行われた。最大のウイルス用量 ( $1 \times 10^{10}$  p f u) を受けた4匹のマウス、および4匹の対照マウスが尾静脈を経由して全長ヒト因子VIII  $500 \text{ ng}$  を注射された。血液が注射の1, 2, 4, 8および1.2時間後に取り出され、エリザによりヒト因子VIII抗原の存在を確認するために分析された。図4.4および図5.5はこの分析の結果を示す。全長因子VIIIの半減期はマウスの両セットで類似しており、約3.0時間あると計算することが出来る。これらのデータから二つの結論が導き出される。1) マウスプラスマの全長因子VIIIおよびBDD因子VIIIの半減期は、それぞれ3時間および4-5時間として比較することが出来、また2) 3週間でマウスの因子VIII発現の喪失はマウスプラスマの特異的抗体による因子VIIIの急速な除去によるものではなく、従って肝臓からのベクターの喪失（あるいはベクターを含有する細胞の喪失）によるものか、もしくは因子VIIIのcDNAの転写の減少による、といふことが出来る。

### 实施例 8

### 实施例 9

### ゲノム要素を持つ因子IX配列を含むアデノウイルスベクターの構築

因子IX配列がゲノム要素、つまりヒト因子IX遺伝子からの配列をとり込んだベクターが調製された。これらの要素は5′ 未翻訳領域、中心切形第一イントロン、完全3′ 未翻訳領域および自然発生ポリアデニル化部位を含んでいた。5′ ゲノム要素はゲノム因子IXクローンを鋳型として用いてPCR増幅により得られた。3個のプライム未翻訳領域がスー博士（中国、上海）から提供されたプラスミドより得られた。これらの要素をた易く得ることの出来る代替的なアプローチはそれらをヒトゲノムDNAからPCR増幅する方法である。

因子IXプロモーターの9塩基対、5′ 未翻訳領域、コーディング領域および3′ 未翻訳領域の162塩基対断片を含む

因子IX配列は、BamHIからHindIII断片としてpKG5IX-2（ユニバーシティ オブ オクスフォード、英国、ジョージ ブラウンリーより得たもの）から切除された。この断片については更にアンソン、他、ネイチャー、315巻、683-685ページ（1985年）に記載されている。この挿入はpBluescript II SK+（ストラタジェン社）のポリリンカーに挿入されBLSKH9CIを形成した（図47）。因子IX配列は完全に配列化されており、正しいものと立証された。ゲノム遺伝子を持つ因子IXDNAはまた、米国特許番号4,994,371およびヨーロッパ特許EPO107 278 B1で開示された方法に従って得ることが出来た。

コーディング配列の下流部分、完全3′ 未翻訳領域、天然因子IXポリアデニル化シグナルおよびポリアデニル化部位の前の331塩基対を含む一つの断片がPpuMIおよびBglIIでpCMVIXa（中国、上海、フーダン ユニバーシティ、ジェリー スーの提供による）から切除された。BglII一本鎖オーバーハングは平滑化された。pBLSKH9CIはPpuMIおよびHindIIIで切断され、HindIII部位は平滑化され、バックボーン断片はPpuMI平滑結合としてpCMVIXaから得られる断片と結合された。生じるプラスミドpBLSKH9D（図48）はプロモーターの9塩基対、5′ 未翻訳領域、完全因子IXコーディング配列、全3′ 未翻訳領域、天然ポリアデニル化シグナ



ルおよびポリアデニル化シグナルから下流の331塩基対を含

んでいる。

中心切形第一イントロンを含む構築物を生成するために、クローニング中間体が調製された。この中間体はコーディング配列から下流のBc1I部位を除去し上流Bc1I部位にクローニングすることを可能にした。pBLSKH9CIにあるcDNAの3'末端はPpuMIからHindIIIに移された。プラスミドバックボーンにある一本鎖オーバーハングは平滑化されpBLH9CINTを産出するために結合された(図49)。

pBLH9CINTにあるcDNAの5'末端は2PCR生成断片を用いて3方向結合を持つ中心切形第一イントロンを含むように修飾された。これらの断片はファージプレップスを鋳型として用いて生成された(吉武、エス、他、バイオケミストリー、24巻、3736-3750ページ(1985年))。2個のPCR生成断片は(5'から3'までに)以下のものを含んでいた。

- 1) SpeI部位、SalI部位、完全5'未翻訳領域、因子IX遺伝子の第一エキソン、因子IX第一イントロンの最初の991塩基対およびAatII部位。
- 2) AatII部位、因子IX第一イントロンの最後の448塩基対および因子IX第2エキソンの上流部分にある自然発生Bc1I部位の前に延びるこのエキソンの一部分。

PCR断片1はSpeIおよびAatIIで消化された。PCR断片2はAatIIおよびBc1Iで消化された。BLH9CINTはSpeIおよびBc1Iで消化され、バックボーン断片は分離された。

クボーン断片は分離された。3個の断片は3方向結合で結合されプラスミドpBLH9EINTを生成した(図50)。このプラスミドは因子IXの5'未翻訳領域、第一エキソン、中心切形第一イントロンおよびPpuMI部位までのコーディング配列を含む。

pBLH9E(図51)を生成するために、コーディング配列の3'末端が再挿入された。因子IX配列の3'末端はpBLSKH9CIから切除され、Ava

I-AvaI断片としてpBLH9EINTバックボーンに挿入された。生成するプラスミドpBLH9E(図51)は因子IX5'未翻訳領域、第一エキソン、中心切形第一イントロン、コーディング領域の残渣および3'未翻訳領域の162塩基対を含んでいた。

pBLH9F(図52)を生成するために、コーディング配列の3'末端および全3'未翻訳領域を含む断片がpBLSKH9Dから切除され、AvaI-AvaI断片としてpBLH9EINTバックボーンに挿入された。かくしてpBLH9Fは5'未翻訳領域、第一エキソン、切形第一イントロン、コーディング配列の残渣、全3'未翻訳領域およびポリアデニル化部位から下流の300塩基対を持つ。

因子IX配列は次いでpBLSKH9D、pBLH9EおよびpBLH9Fから切除され、SpeI-ClaI断片としてpAvS6バックボーンに挿入された。生成するプラスミドはそれぞれpAV1H9D(図53)、pAV1H9EおよびpAV1H9Fと名付けられた。しかしpAV1H9Eおよび

pAV1H9Fが配列化された時、過誤が因子IX遺伝子の5'未翻訳領域で発見された。これらの過誤は修復された。配列の過誤はpBLH9EINTまでさかのぼり探し出された。ミニプレップ1個のプラスミドは以下のプラスミド生成のために使用されてきた。pBLH9EINTミニプレップ6は正しい配列を持つことが発見された。pBLH9EINTミニプレップ6にあるSpeIからAptIIまでの断片はpAV1H9EおよびpAV1H9Fにある対応する断片に取り替り、それぞれpAV1H9ER(図54)およびpAV1H9FRを産出するために使用することが出来た。これらのプラスミドはアデノウイルスタイプ5ITR、RSVプロモーター、三部分リーダー、因子IX配列、SV40ポリアデニル化部位(これはpAV1H9DおよびpAV1H9FR内では余分のもの)およびアデノウイルス相同組換え領域を含む。

pAV1H9D、pAV1H9ERおよびpAV1H9FRは次いで前記記載のアデノウイルスベクターを生成するために使用された。要約すると、線形化プラスミドはAd d1327の大型ClaI切断断片を293細胞に挿入して同

時形質移入された。プラークは選択され、拡大され、スクリーンされた。選択された3個のベクター分離物はAd1H9D、Ad1H9ER、Ad1H9FRと名付けられた。これは大規模プレップに成長し、プラークは293細胞に力価された。

### 実施例10

$2 \times 10^8$  p f u のAv1H9B、Ad1H9D、Ad1H9ER

あるいはAd1H9FRが尾静脈を経由してC57B1/6マウスに注射された。2匹のマウスはそれぞれウイルスを受けた。1週間後プラスマはそれぞれヒト因子IX抗原および生物活性のためエリザおよび前記記載の免疫色素形成生化学的検定によりサンプル化された。図56で示されるエリザの結果は、ゲノム要素の取り込みが因子IXの発現を劇的に増加させたことを示す。Ad1H9FRベクターは最大の発現を成し遂げ、それはAv1H9Bで得られた水準より200倍も大きかった。8匹の実験マウスおよび1匹の負の対照マウス（後者はペータガラクトシダーゼベクター、Av1LacZ4を注射された）は下記の表IVで示される。

表IV

ベクター	マウス番号	プラスマ因子IX (ng/ml)	
		エリザ	免疫色素形成
Av1H9B	1	<8	<8
Av1H9B	2	<8	<8
Ad1H9D	3	74	65
Ad1H9D	4	48	49
Ad1H9ER	5	116	102
Ad1H9ER	6	101	80
Ad1H9FR	7	1,339	1,051
Ad1H9FR	8	1,467	1,391
Av1LacZ4	9	<8	<8

これらの結果は、Ad1H9D、Ad1H9ERおよびAd1H9FRから発現されたヒト因子IXが機能的であることを示した。肝臓はベクター注射1週間後

に収穫され、DNAおよびRNAが調製された。サザン分析は4個のベクターすべて

に対し肝細胞当りベクターコピーが平均1-2個であることを示した（データは示されていない）。ノーザン分析は因子IXプラスマ水準に匹敵する帯強度を持つそれぞれのベクターに対する正しいサイズのRNA種を明らかにした。（データは示されていない）。

#### 実施例 1 1

$1 \times 10^9$  p f uのA v 1 H 9 B、A d 1 H 9 BあるいはA d 1 H 9 E Rが尾静脈を経由してC 5 7 B 1 / 6 マウスに注射された。 $5 \times 10^7$  p f uのA d 1 H 9 E RおよびA d 1 H 9 F RもまたC 5 7 B 1 / 6 マウスに尾静脈注入で投与された。各養生のためのコホートサイズはマウス5匹であった。指定された時点でプラスマは獲得されヒト因子IXのためエリザで検定された。図57および58で示された結果は、再度ゲノム要素の因子IX配列への取り込みが劇的に因子IX発現を増加させたことを示す。標準に接近する因子IXの水準はA d 1 H 9 DおよびA d 1 H 9 E Rの $1 \times 10^9$  p f uという低い用量で得られた。A d 1 H 9 F Rの $5 \times 10^7$  p f uのきわめて低い用量の注射がマウスにあるヒト因子IXの潜在的な治療水準の発現に帰着した。それぞれの場合において、A d 1 H 9 D、A d 1 H 9 E RおよびA d 1 H 9 F Rからの高水準の発現は、実験の10-12週にわたる存続した。これはA v 1 H 9 Bのより高度な用量でこれまでに達成された発現の7週間継続を上回ることになった。

#### 実施例 1 2

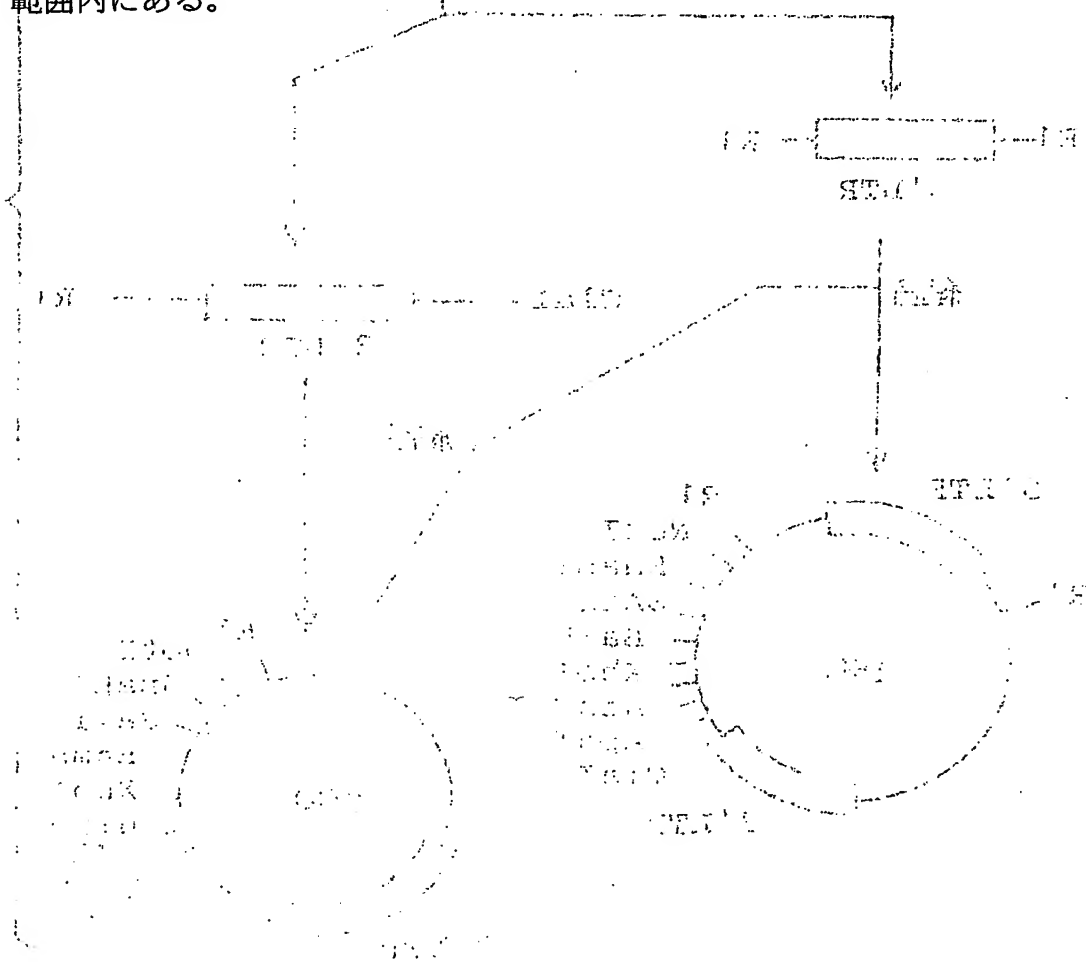
A v 1 H 9 B、A d 1 H 9 DおよびA d 1 H 9 E Rからの発

現は組織培養で検証された。H e p G 2 およびヒーラ細胞は2の感染多重度（細胞当り2 p f u）で形質導入された。48時間後培地は採取されヒト因子IXをエリザで検定された。図59で示されるデータは、 $2 \times 10^8$  p f uのウイルスを受けたマウスに生体内で見られるものに対応するA d 1 H 9 DおよびA d 1 H 9 E Rを持つH e p G 2 細胞の改良が増加していることを示す。ヒーラ細胞では、

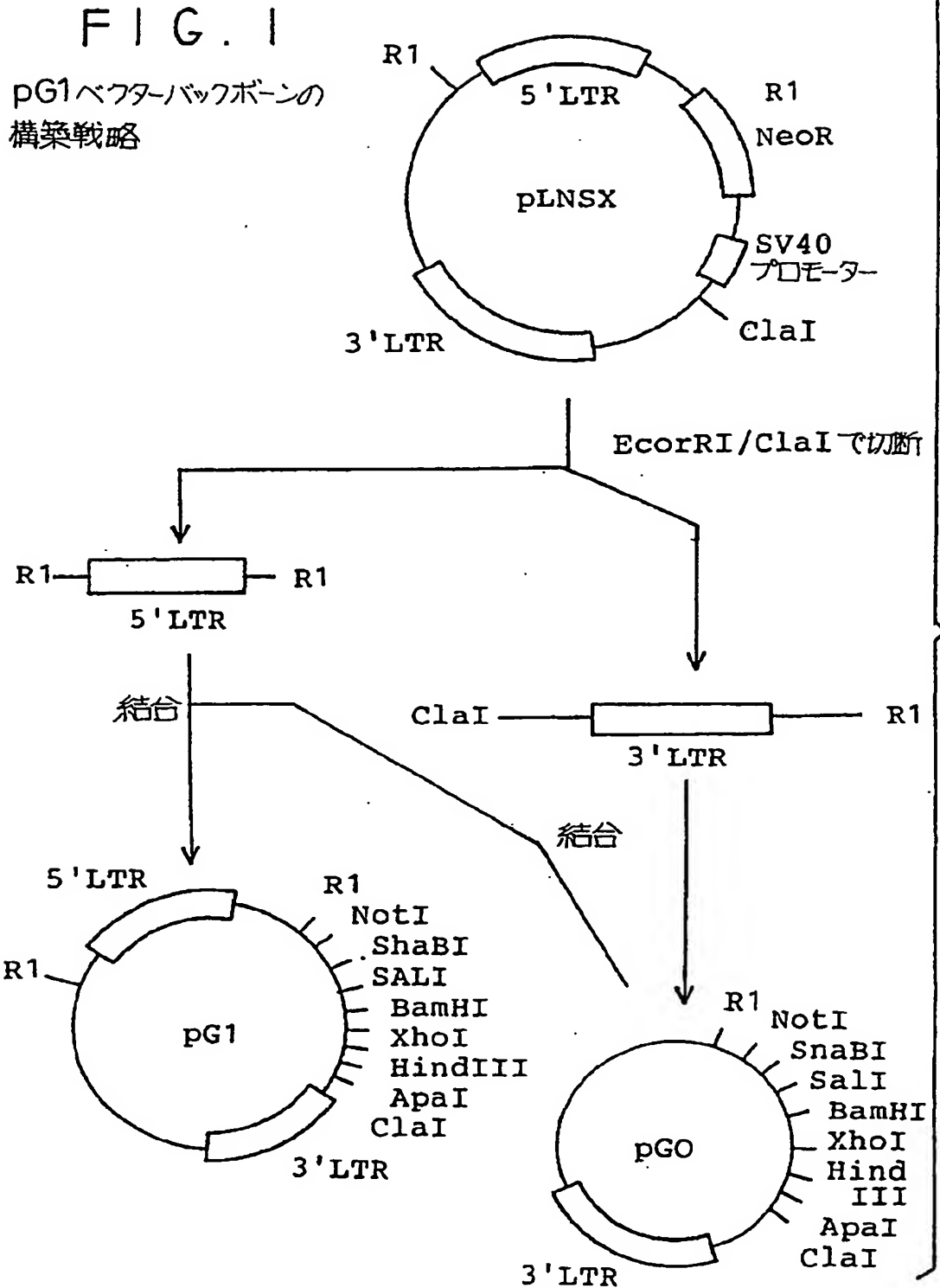
3' 未翻訳領域 (A d 1 H 9 D) の取り込みが何らかの効果も示さず、一方イントロン (A d 1 H 9 E R) の取り込みは発現を劇的に改良した。

この明細書で引用されるすべての特許、公開情報およびデータベース入力はこの発明が関係する当業者の水準を示している。このような特許、公開情報（公開特許出願を含む）およびデータベース入力すべての開示は、これらの個別の特許、公開情報およびデータベース入力が特異的かつ個別に引用として取り込まれていることを示すかのようにその全体として同じ範囲で引用文献としてここに特異的に取り込まれている。

しかしこの発明の範囲は前記の特異な実施例に限定されるものではない。この発明は特に前記のもの以外にも実施することが出来、しかもなお添付する請求の範囲内にある。



【図1】



100

2000

G1 プラスミド内での多重クロニング部位の配列

1/2 EcoRI CC NotI SnaBI AGGG SaII TCT BamHI TTT XhoI HindIII ApaI  
AATTC TTT GCGGCGGC TAGGTAC TGGAC TGGATCC CTCGAG TCA AAGCTT GGGCGC  
GGT CCGCGC GATGCAT GAGCTG TCTTAGG GAGCTC TCA TTCGAA CCGCGG  
1/2 ClaI CCGTATC CCGCTT TCA CCGCTT CCGCTT CCGCTT CCGCTT CCGCTT CCGCTT CCGCTT

AT

**TAGC**

## FIG. 11A

```

1  AGGTTATGCA GCGGTGAAC ATGATCATGG CAGAATCACC AGCCTCATC ACCATCTGCC
61  TTTTAGGATA TCTACTCAGT GCTGAATGTA CAGTTTCTTCT TGATCATGAA AACGCCAACA
121  AAATTCTGAA TCGGCCAAG AGGTATAATT CAGGTAATT GGAAGAGTTT GTTCAAGGGA
181  ACCTTGAGAG AGAATGTATG GAAGAAAAGT GTAGTTTGA AGAAGCACCA GAAGTTTTTG
241  AAAACACTGA AAGAACAAC TTTTAAATGGC GGCAGTTGCA AGCAGTATGT TGATGGAGAT CAGTGTGAGT
301  CCAATCCATG ATTTGAAGG AAGAACTGTG AATTAGATGT AACATGTAAC ATTAAGAATG
361  GTCCCTTTGG GCAGTTTGT AAAAATAGTG CTGATAACAA GGTGGTTTGC TCCTGTACTG
421  GCAGATGCCA ACTTGCAGAA AACCAGAACT CCTGTGAACC AGCAGTGCCA TTTCATGTG
481  AGGATATCG TGTTCACAA ACTTCTAAGC TCACCCGTGC TGAGACTGTT TTTCCCTGATG
541  GAAGAGTTTC TGGACTATGT AAATTCTACT GAAGCTGAAA CCATTTTGA TAACATCACT CAAAGCACCC
601

```

FIG. 11B に接続



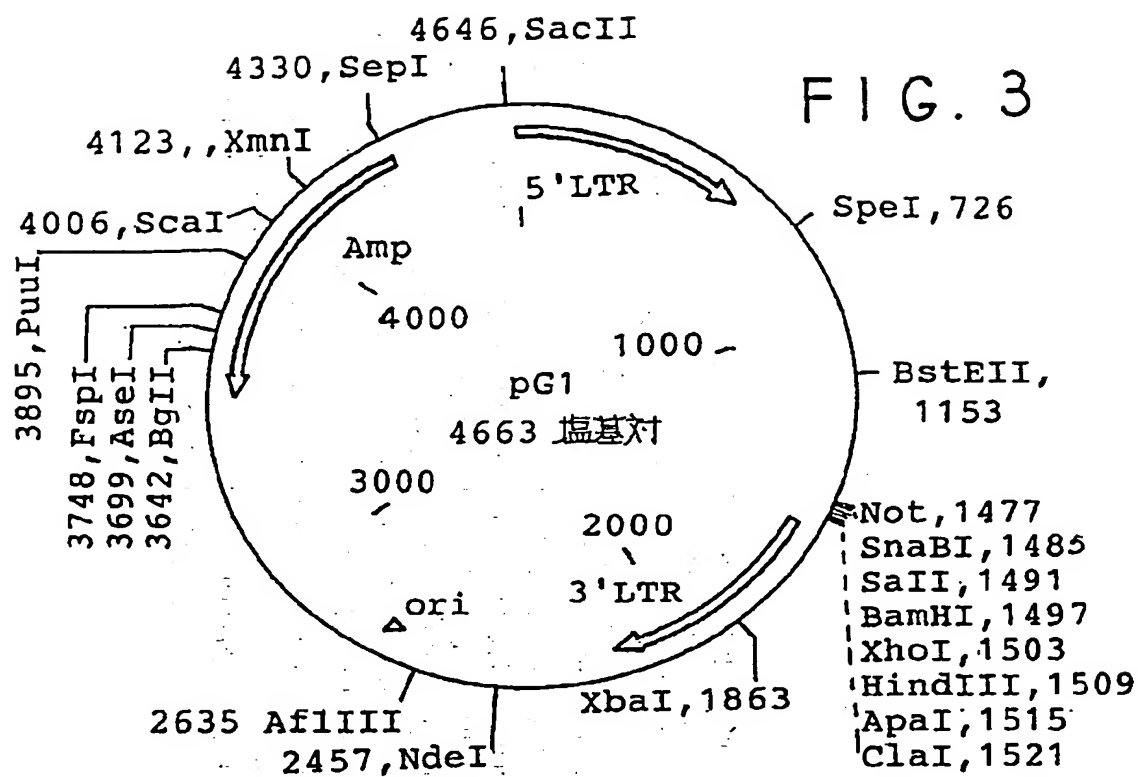
【図11】

## FIG. 11B

FIG. 11A に接続

661 AATCATTTAA TGACTTCACT CGGGTTGTTG GTGGAGAAGA TGCCAAACCA GGTCAATTCC  
 721 CTTGGCAGGT TGTTTTGAAT GGTAAGTTG ATGCATTCTG TGGAGGCTCT ATCGTTAATG  
 781 AAAAATGGAT TGTAACTGCT GCCCACTGTG TTGAAACTGG TGTAAATTT ACAGTTGTCG  
 841 CAGGTGAACA TAATATTGAG GAGACAGAAC ATACAGGGA AAAGCGAAAT GTGATTTCGAA  
 901 TTATTCCTCA CCACAACCTAC AATGCAGCTA TTAATAAGTA CAACCATGAC ATTGCCCTTC  
 961 TGGAACTGGA CGAACCCCTTA GTGCTAAACA GCTACGTTAC ACCTATTTC ATTGCTGACA  
 1021 AGGAATACAC GAACATCTTC CTCAAATTG GATCTGGCTA TGTAAGTGGC TGGGGAAGAG  
 1081 TCTTCCACAA AGGAGATCA GCTTTAGTTC TTCAGTACCT TAGAGTTCCA CTTGTTGACC  
 1141 GAGCCACATG TCTTCGATCT ACAAGTTCA CCATCTATAA CAACATGTTT TGTGCTGGCT  
 1201 TCCATGAAGG AGGTAGAGAT TCATGTCAAG GAGATAGTGG GGGACCCCAT GTTACTGAAG  
 1261 TGGAAAGGAC CAGTTTCTTA ACTGGAATTA TTAGCTGGGG TGAAGAGTGT GCAATGAAAG  
 1321 GCAAAATATG AATATATACC AAGTATCCC GGTATGTCAA CTGGATTAA GAAATAACAA  
 1381 AGCTCACTTA ATGAAAGATG GATTTCCAAG GTTAATTCTAT TGAATTGAA AATTAACAGG  
 1441 GCCTCTCACT AACTAATCAC TTTCCCATCT TTTGTTAGAT TTGAATATAT ACATTCTATG  
 1501 ATCATTTGCTT TTTCTCTTTA CAGGGAGAA TTTCATATTT TACCTGAG

【図3】



【图4】

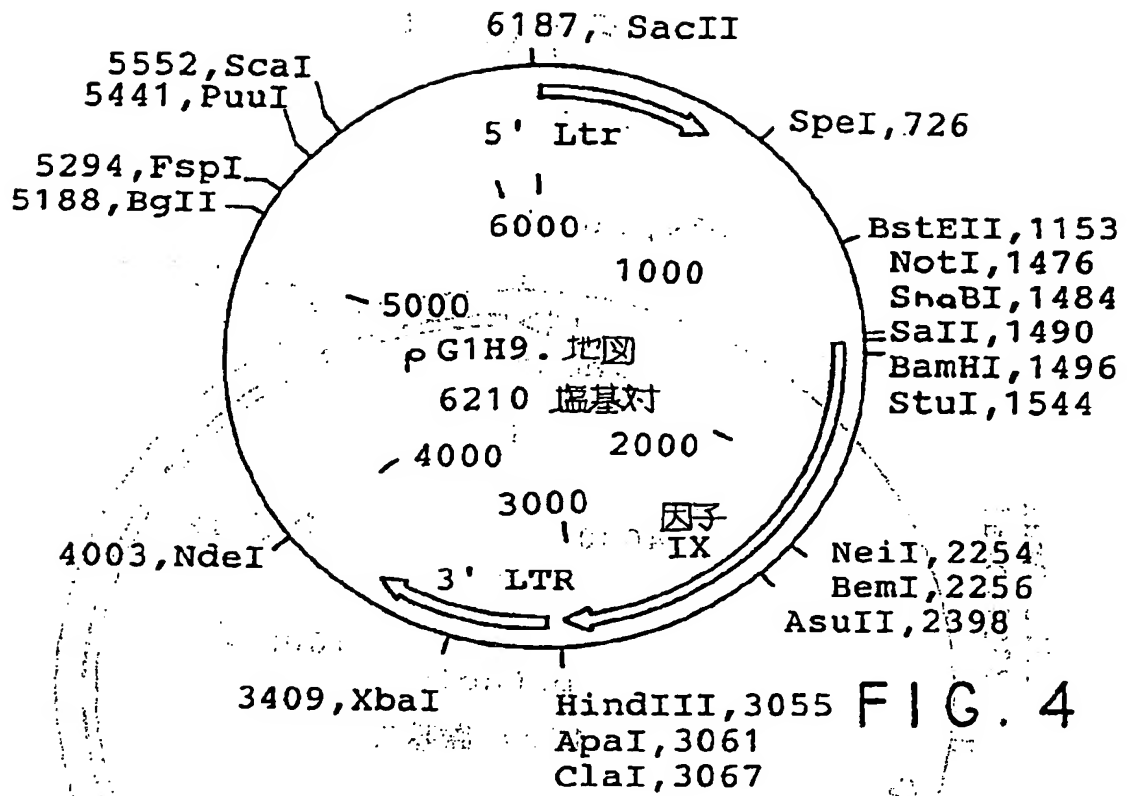
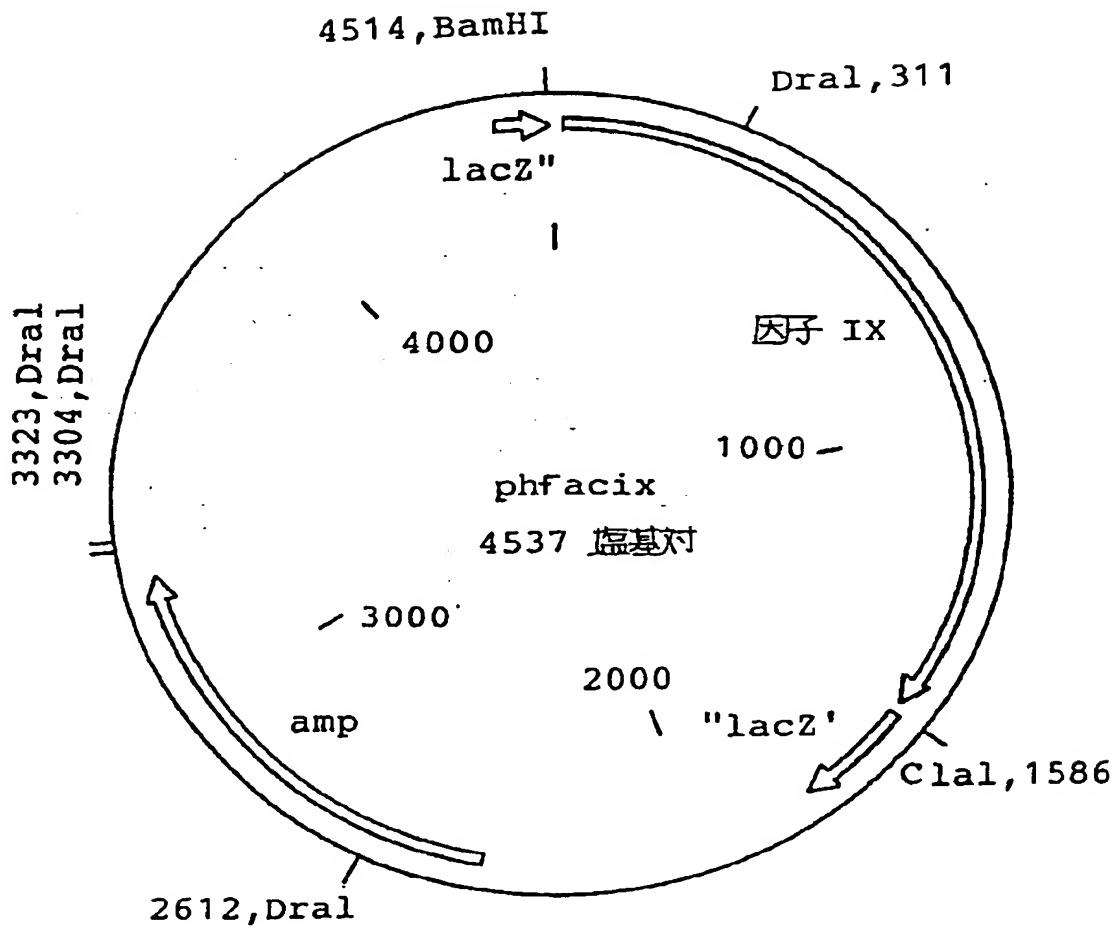


FIG. 4

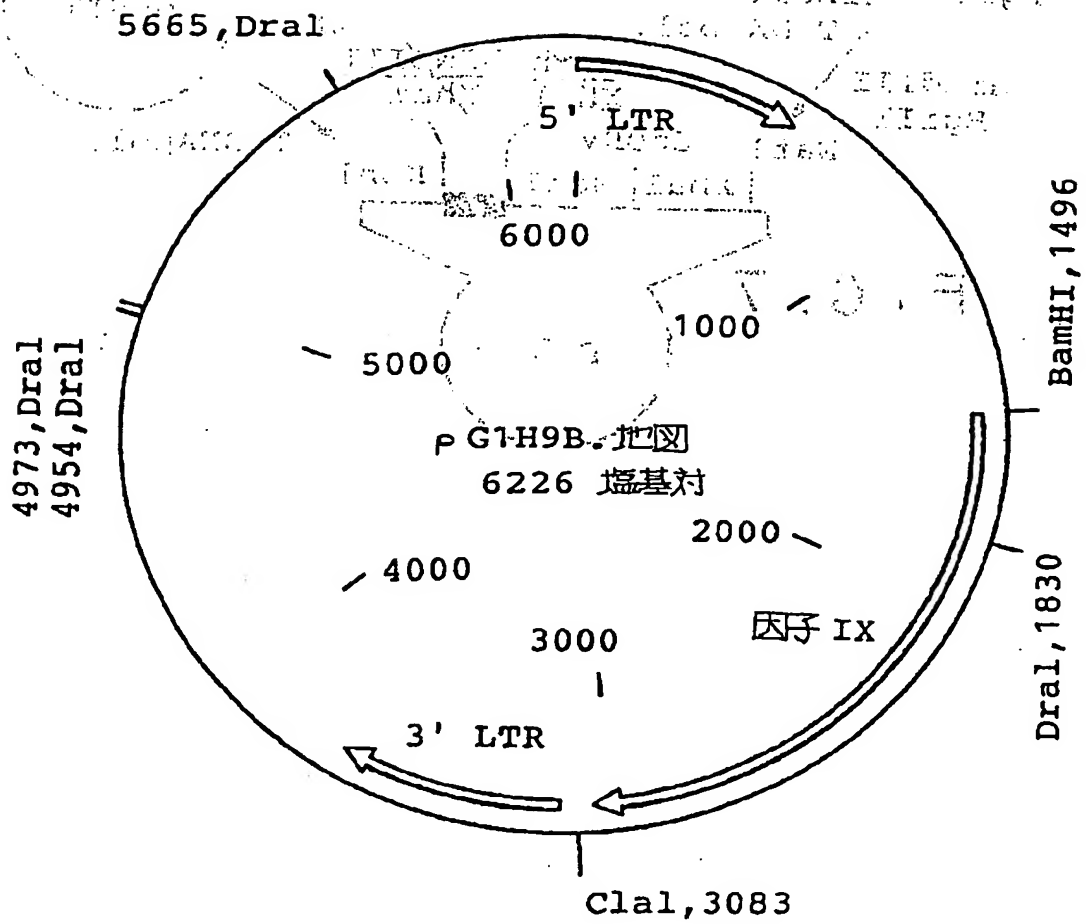
【图5】

FIG. 5

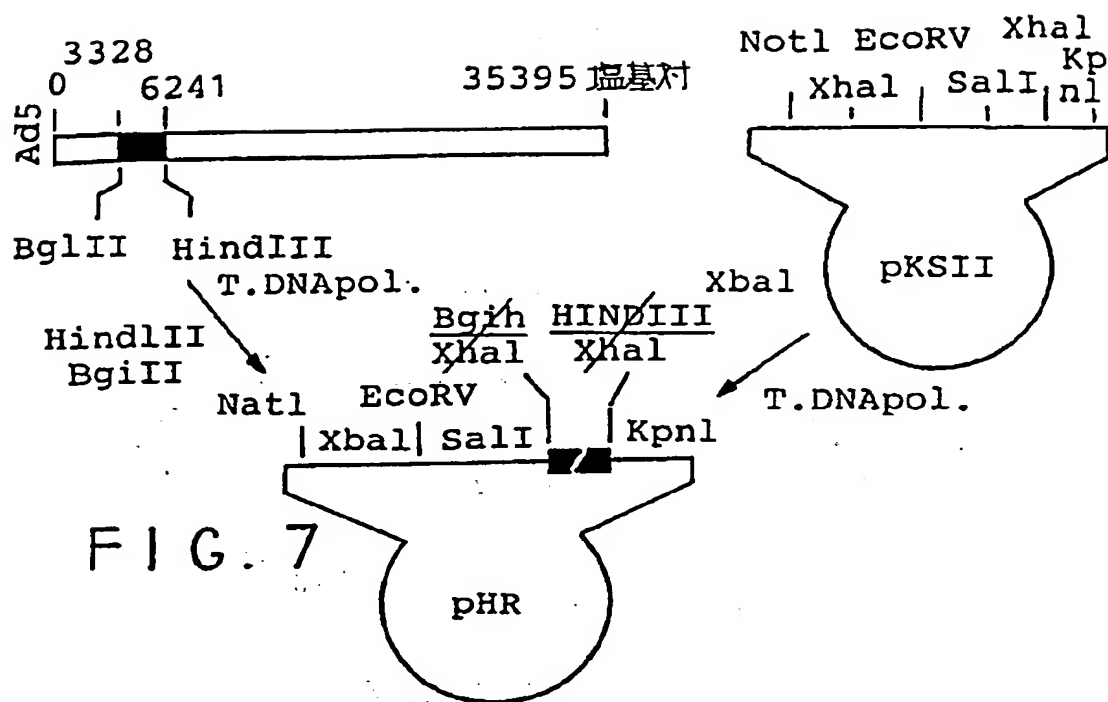


【图6】

FIG. 6



【图7】



【図10】

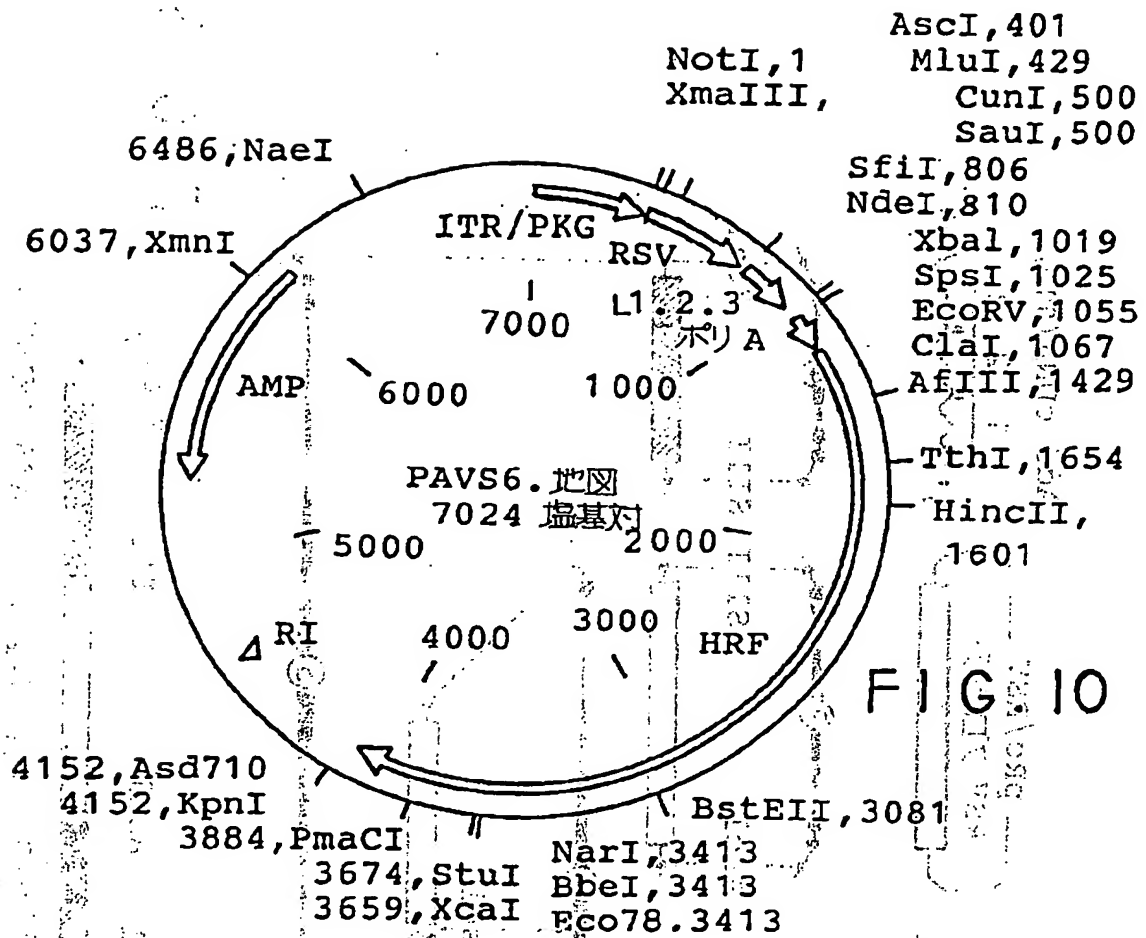


FIG 10

【図8】

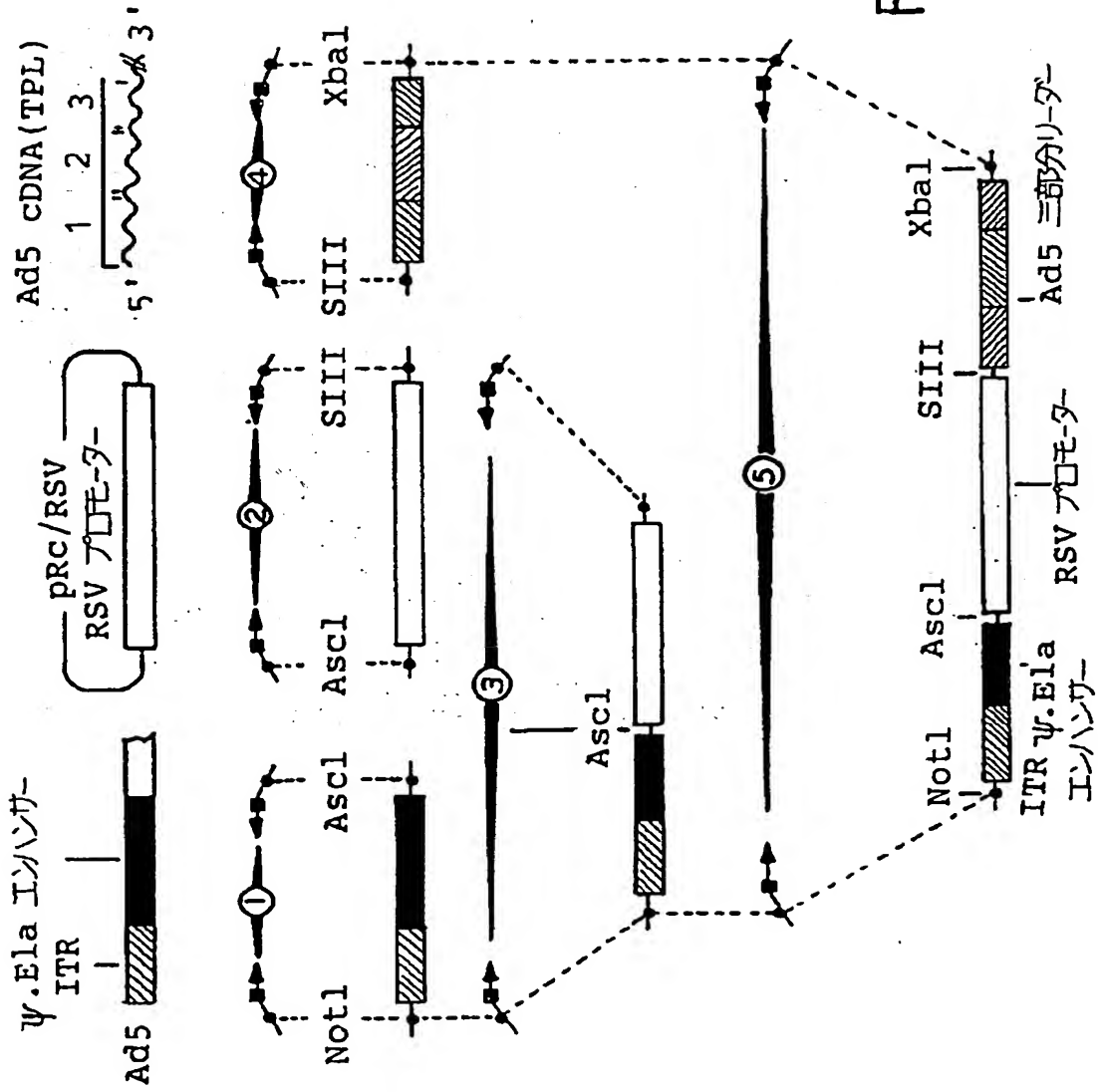
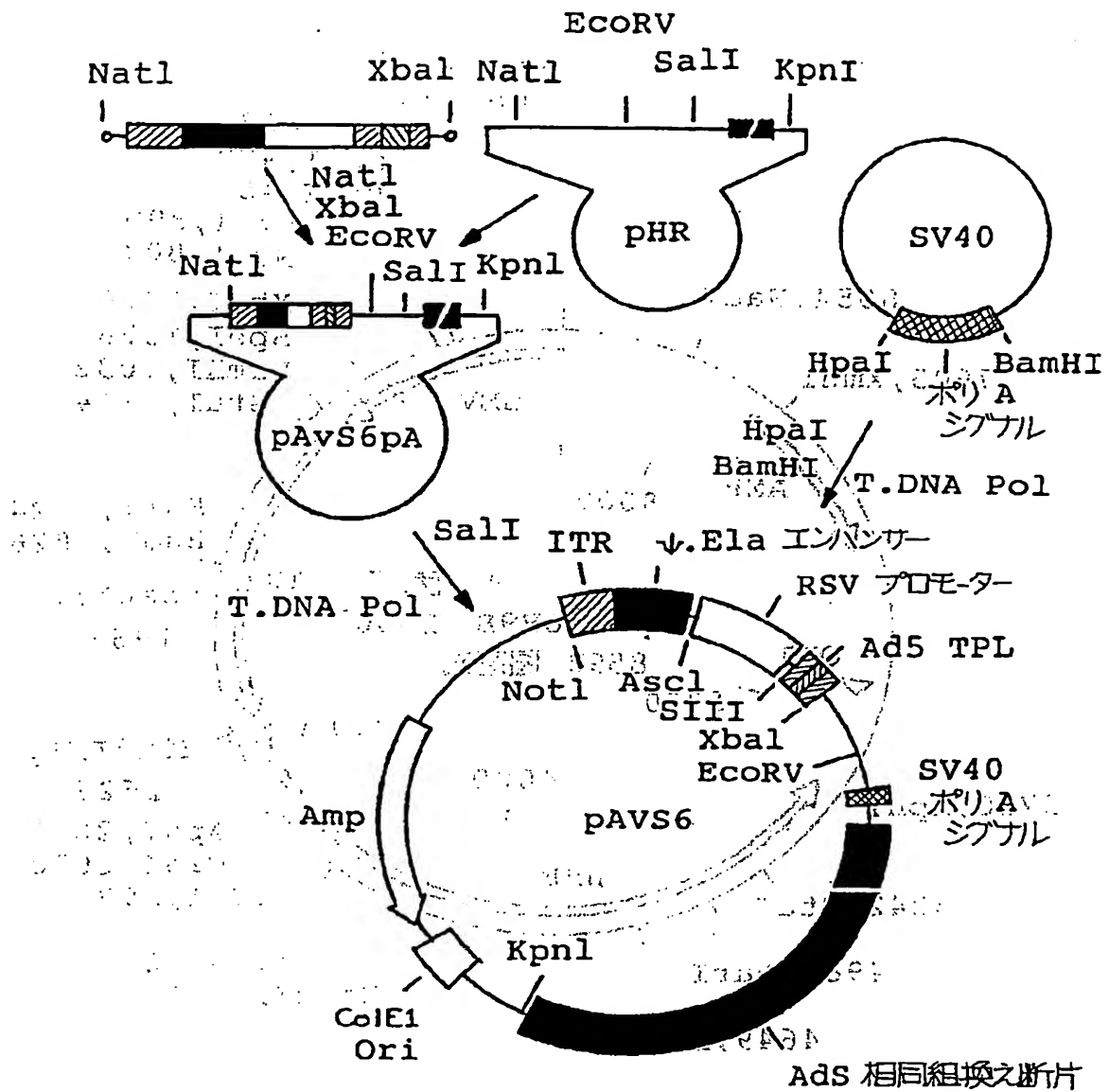


FIG. 8



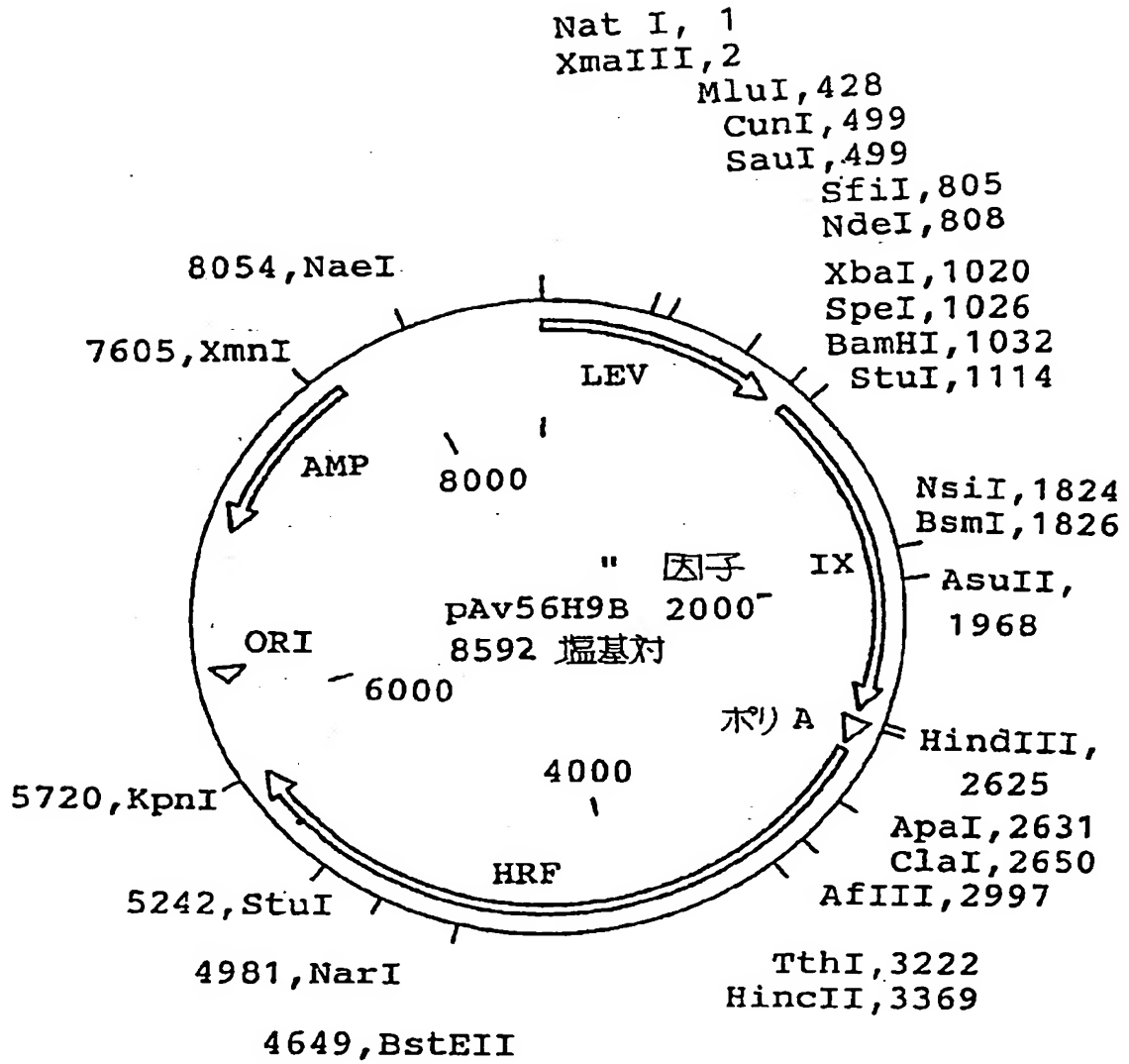
【図9】

FIG. 9



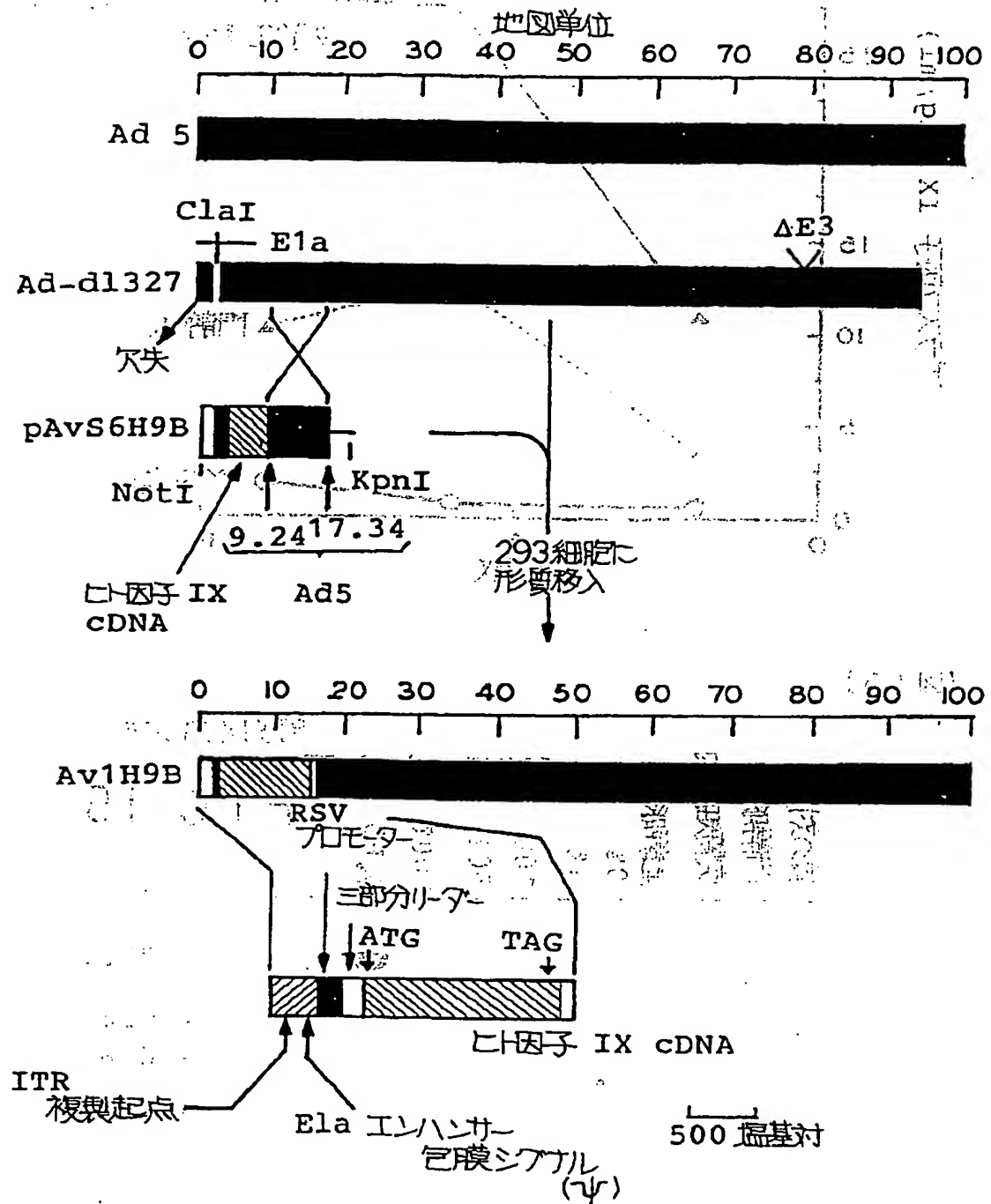
【図12】

FIG. 12

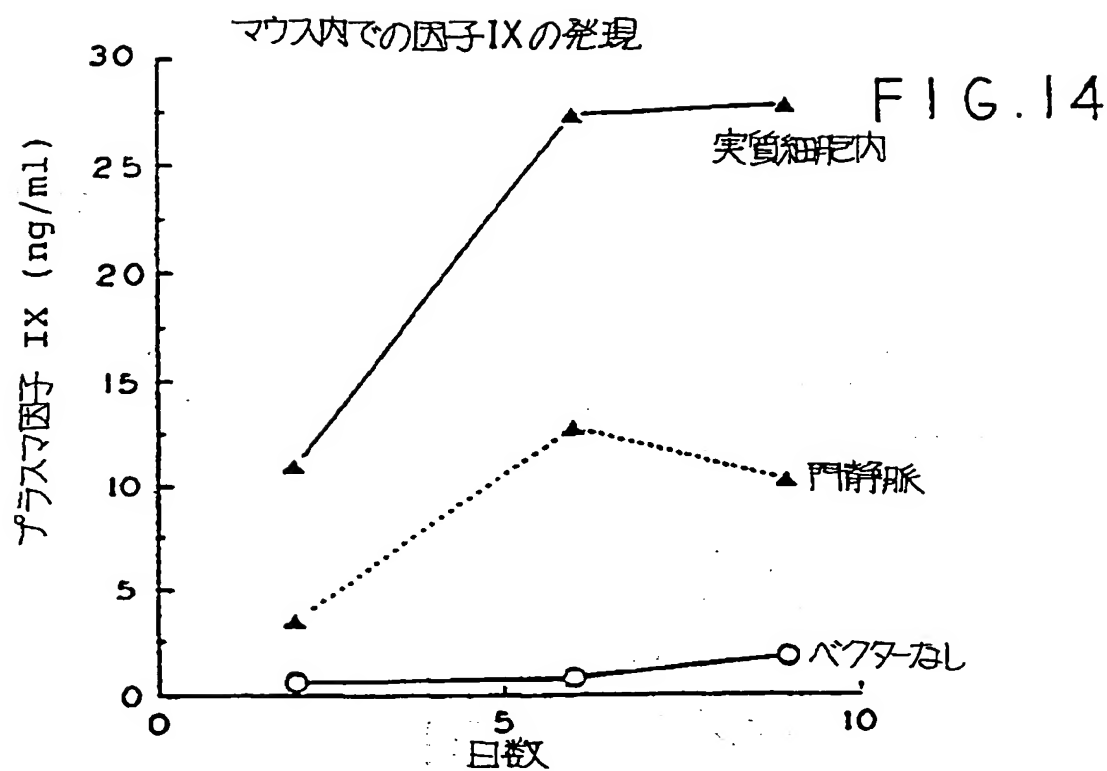


【図13】

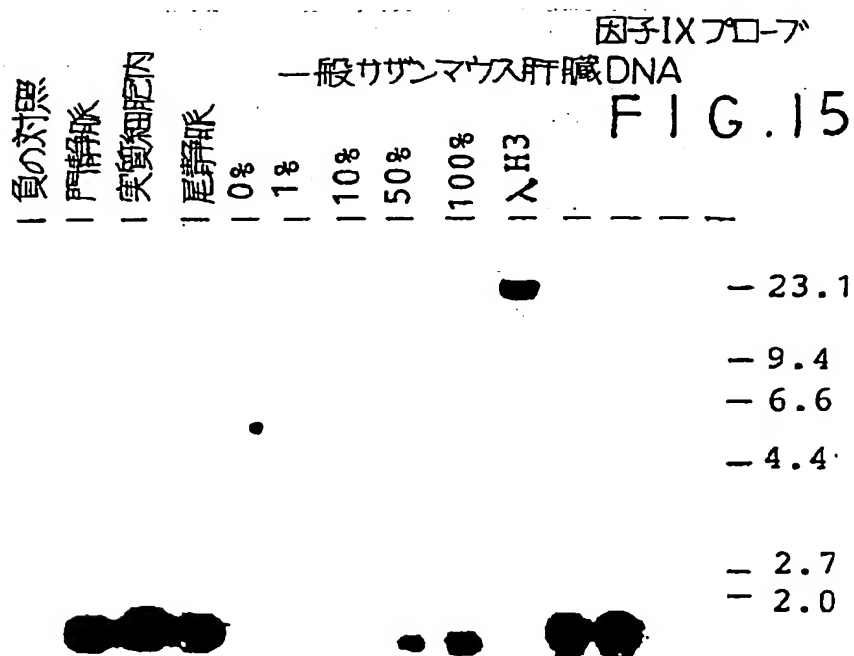
FIG. 13



【図14】



【図15】



1 2 3 4 5

5398, XbaI<sup>+</sup> Apal, 4647  
BspMII, 4676

【図 17】

## FIG. 17A

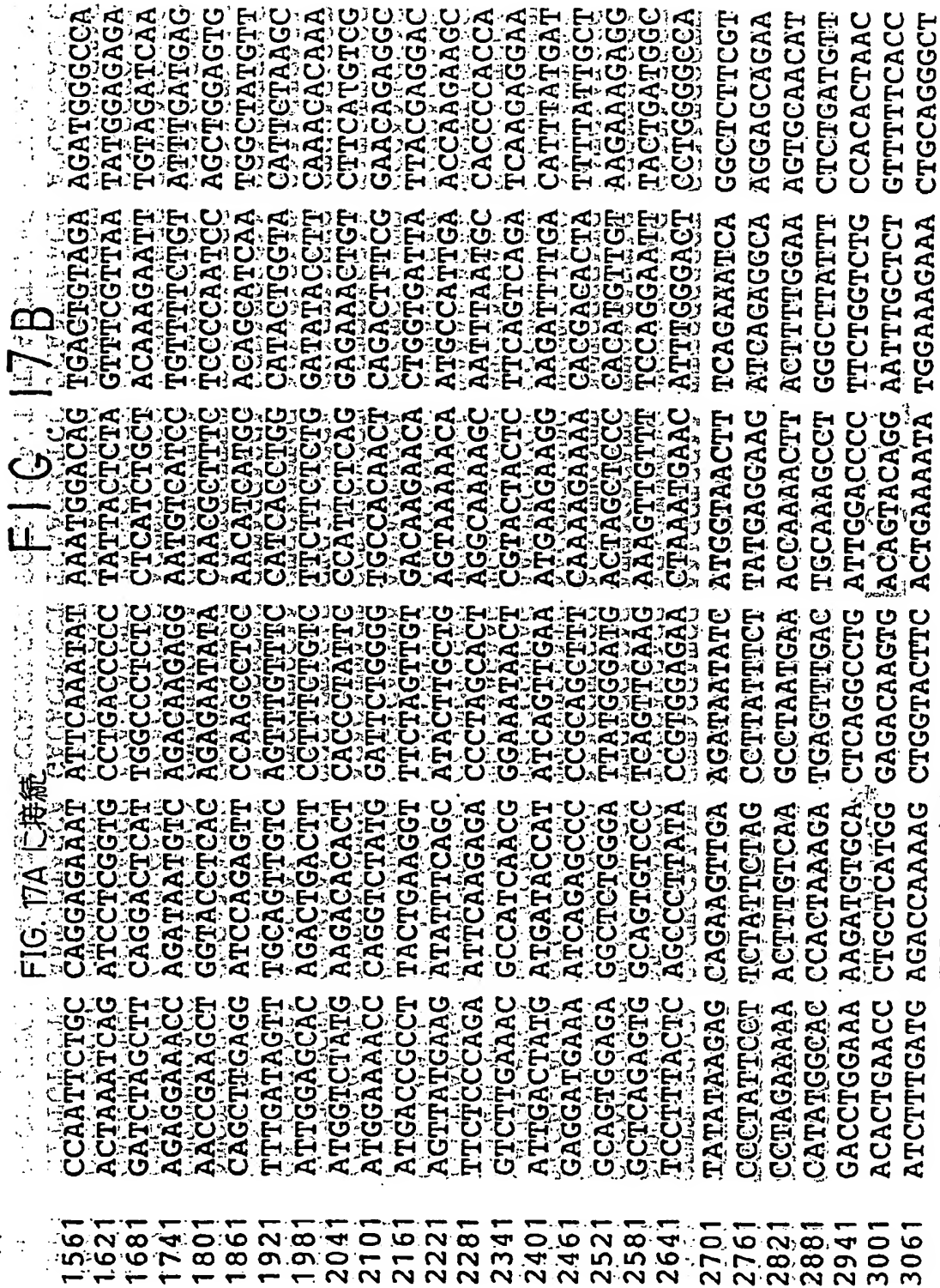
```

1  ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGGATTCTG CTTTAGTGCC
61 ACCAGAAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTGAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGTTCACTT TTTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GGCCACCTCG GATGGGTCTG CTAGTTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTC
361 GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGCTG GCAGGTCCTG
481 AAAGAGAAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTACT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATATACTT TTTTGTCTGA
661 TTTGATGAAG GGAAGAGTTG GCACTCAGAA ACAAGAAGT CATTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCTTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGG
841 ACCACTCCTG AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTGTCAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATCTCGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGTGACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCCTCGC
1261 CCCGATGACA GAAGTATATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATGGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGACCTT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG
1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAACATTT GAAGGATTTT

```

FIG. 17B に接続

【図17】



【図17】

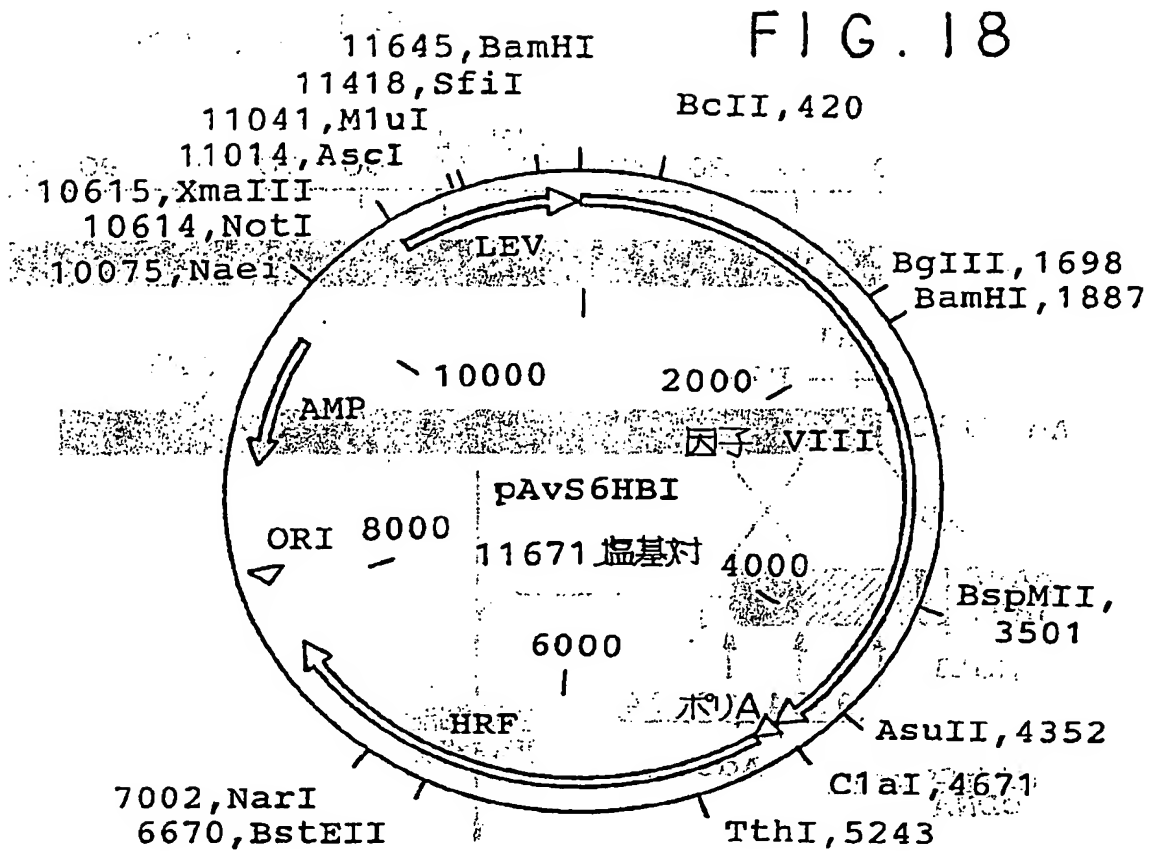
## FIG. 17C

FIG. 17B に接続

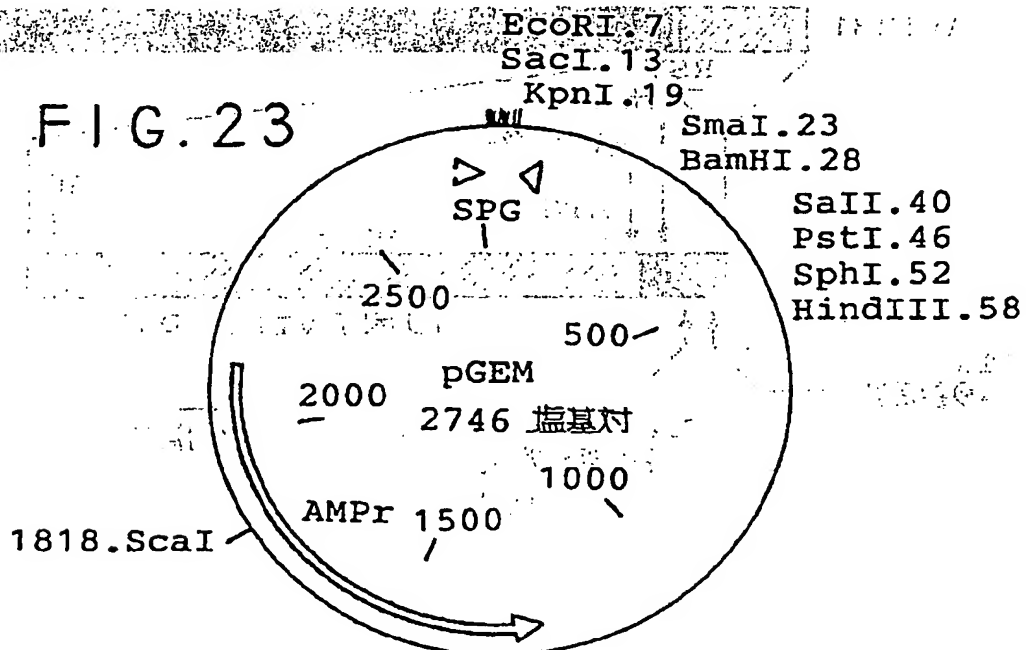
3121	CCCTGCAATA	TCCAGATGGA	AGATCCCACT	TTTAAAGAGA	ATTATCGCTT	CCATGCAATC
3181	AATGGCTACA	TAATGGATAC	ACTACCTGGC	TTAGTAATGG	CTCAGGATCA	AAGGATTGGA
3241	TGGTATCTGC	CTAGCATGGG	GAGCAATGAA	AACATCCATT	CTATTCAATT	CAGTGGACAT
3301	GTGTTCACTG	TACGAAAAAA	AGAGGAGTAT	AAAATGGCAC	TGTACAATCT	CTATCCAGGT
3361	GTTTTTGAGA	CAGTGGAAAT	GTTACCATCC	AAAGCTGGAA	TTTGGCGGGT	GGAATGCCCT
3421	ATTGGCGAGC	ATCTACATGC	TGGGATGAGC	ACACTTTTTC	TGGTGTACAG	CAATAAGTGT
3481	CAGACTCCCC	TGGGAATGGC	TTCTGGACAC	ATTAGAGATT	TTCAGATTAC	AGCTTCAGGA
3541	CAATATGGAC	AGTGGGCCCC	AAAGCTGGCC	AGACTTCATT	ATTCCGGATC	AATCAATGCC
3601	TGGAGCACCA	AGGAGCCCCT	TTCTTGGATC	AAGTGGATC	TGTTGGCACC	AATGATTATT
3661	CACGGCATCA	AGACCCAGGG	TGCCCGTCAG	AAGTCTCCA	GCCTCTACAT	CTCTCAGTTT
3721	ATCATCATGT	ATAGTCTTGA	TGGGAAGAAG	TGGCAGACTT	ATCGAGGAAA	TTCCACTGGA
3781	ACCTTAATGG	TCTTCTTTGG	CAATGTGGAT	TCATCTGGGA	TAAAACACAA	TATTTTTAAC
3841	CCTCCAATTA	TTGCTCGATA	CATCCGTTTG	CACCCAATC	ATTATAGCAT	TCGCAGCACT
3901	CTTCGCATGG	AGTTGATGGG	CTGTGATTTA	AATAGTTGCA	GCATGCCATT	GGGAA'GGAG
3961	AGTAAAGCAA	TATCAGATGC	ACAGATTACT	GCTTCATCCT	ACTTTACCAA	TATGTTTGCC
4021	ACCTGGTCTC	CTTCAAAGC	TCGACTTCAC	CTCCAAGGGA	GGAGTAATGC	CTGGAGACCT
4081	CAGGTGAATA	ATCCAAAAGA	GTGGCTGCAA	GTGGACTTCC	AGAAGACAAAT	GAAAGTCACA
4141	GGAGTAACTA	CTCAGGGAGT	AAAATCTCTG	CTTACCAGCA	TGTATGTGAA	GGAGTTCCTC
4201	ATCTCCAGCA	GTCAAGATGG	CCATCAGTGG	ACTTCTTTT	TTTCAAGATGG	CAAAGTAAAG
4261	GTTTTTTCAGG	GAAATCAAGA	CTCCTTCACA	CCTGTGGTGA	ACTCTCTAGA	CCCACCGTTA
4321	CTGACTCGCT	ACCTTCGAAT	TCACCCCCAG	AGTTGGTGGC	ACCAGATTGC	CCTGAGGATG
4381	GAGGTTCTGG	GCTGCGAGGC	ACAGGACCTC	TACTGAGGGT	GGCCACTGCA	GCACCTGCCA
4441	CTGCCGTCAC	CTCTCCCTCC	TCAGCTCCAG	GGCAGTGTCC	CTCCCTGGCT	TGCCCTCTAC
4501	CTTTGTGCTA	AATCCTAGCA	GACACTGCCT	TGAAGCCCTC	TGAATTAACT	ATCATCAGTC
4561	CTGCATTTCT	TTGGTGGGGG	GCCAGGAGGG	TGCATCCCAAT	TTAACTTAAC	TCTTACCCTAT
4621	TTTCTGCAG					



【図18】

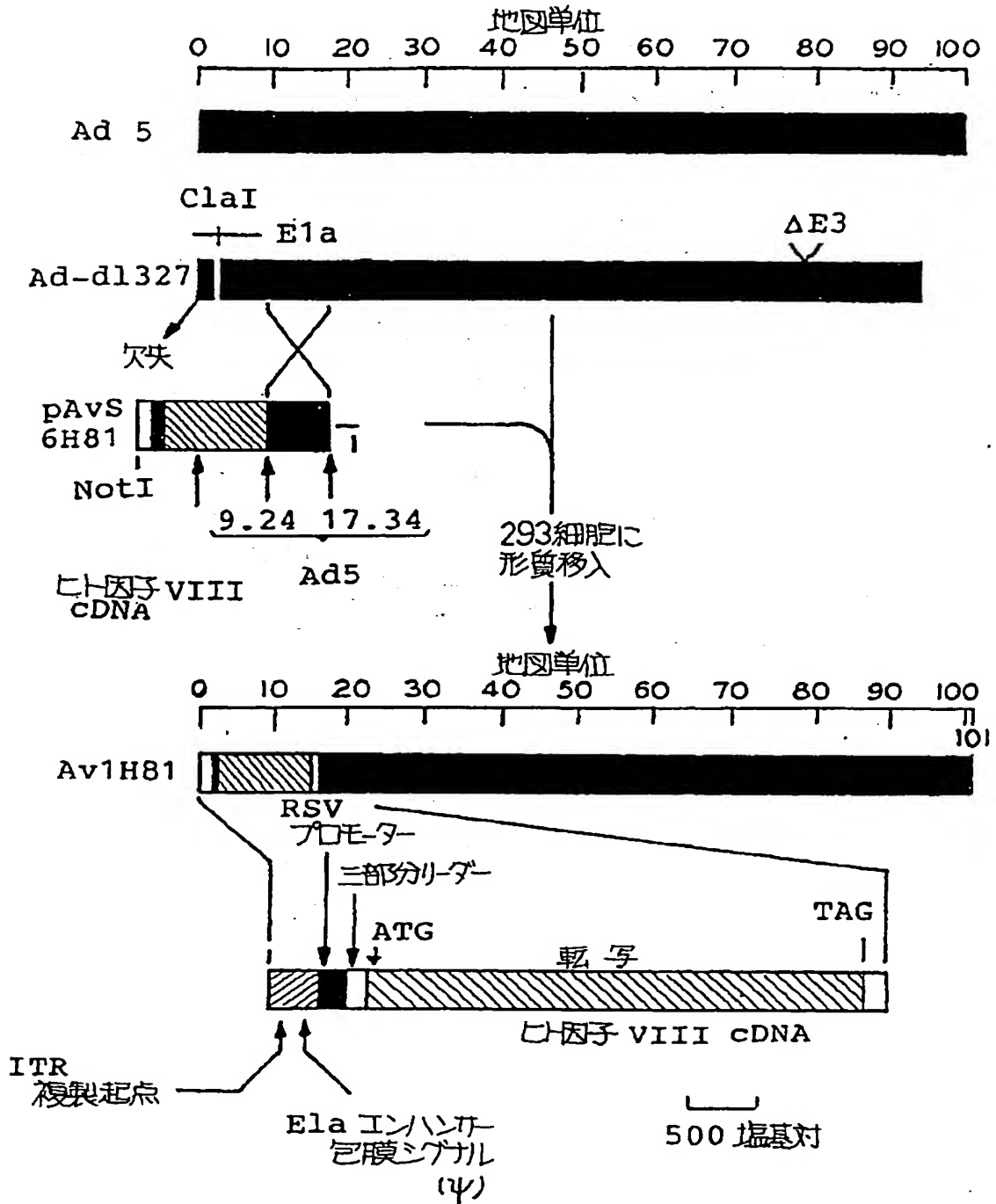


【図23】

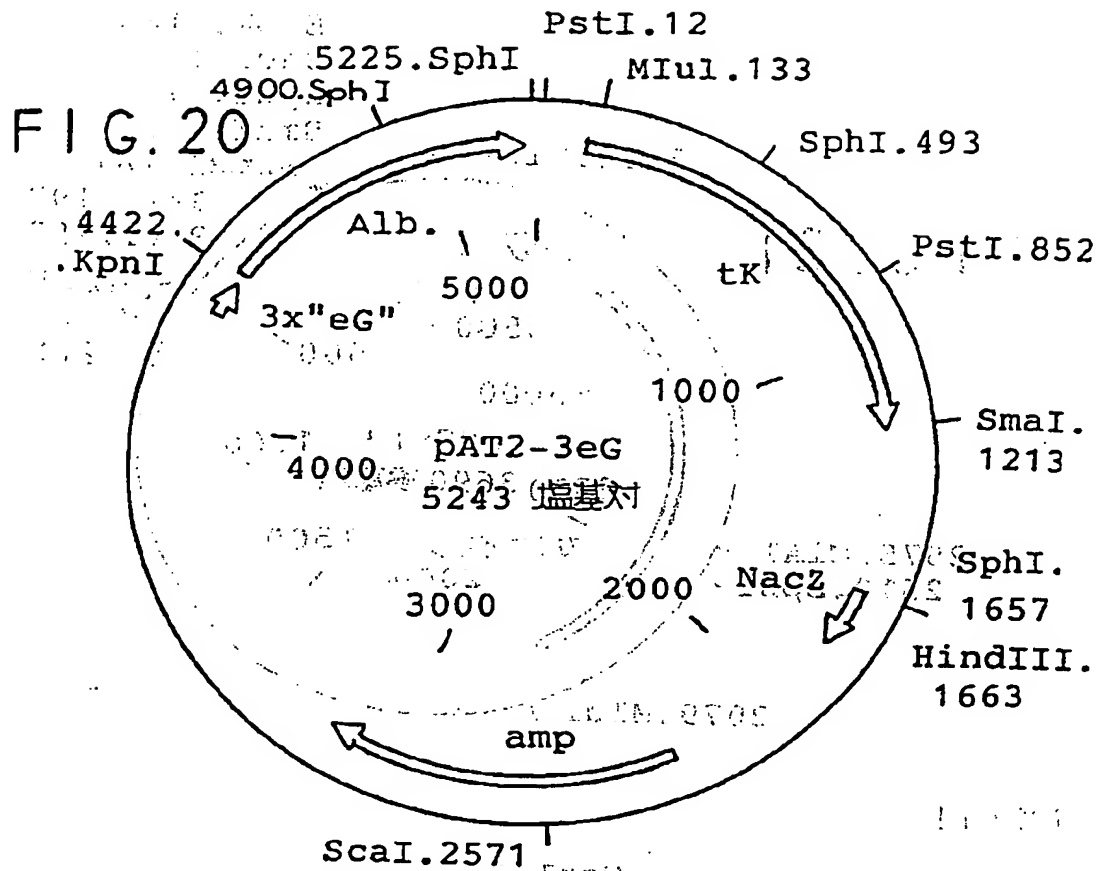


【図19】

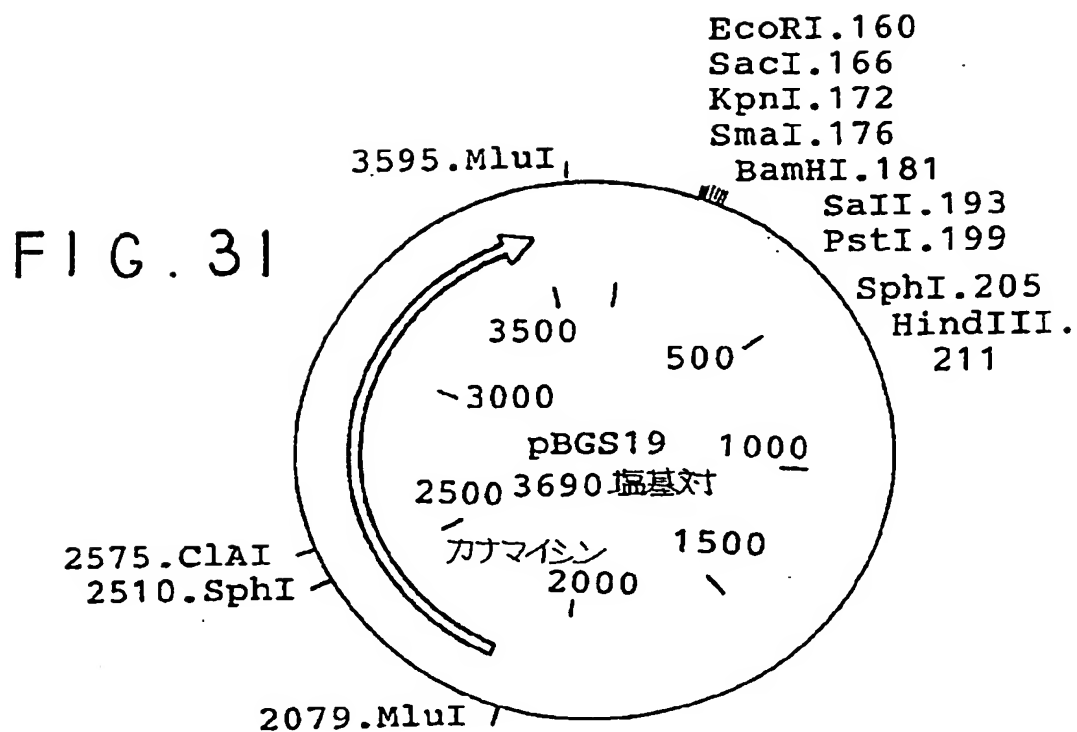
FIG. 19



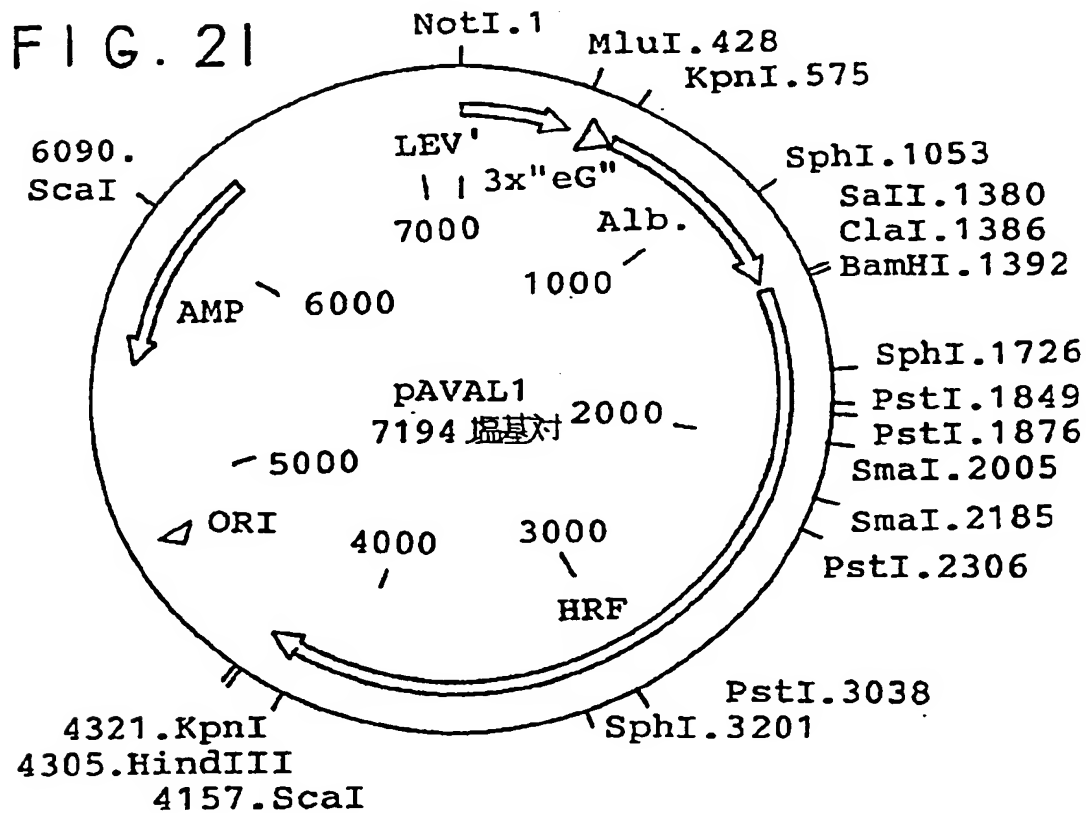
【图20】



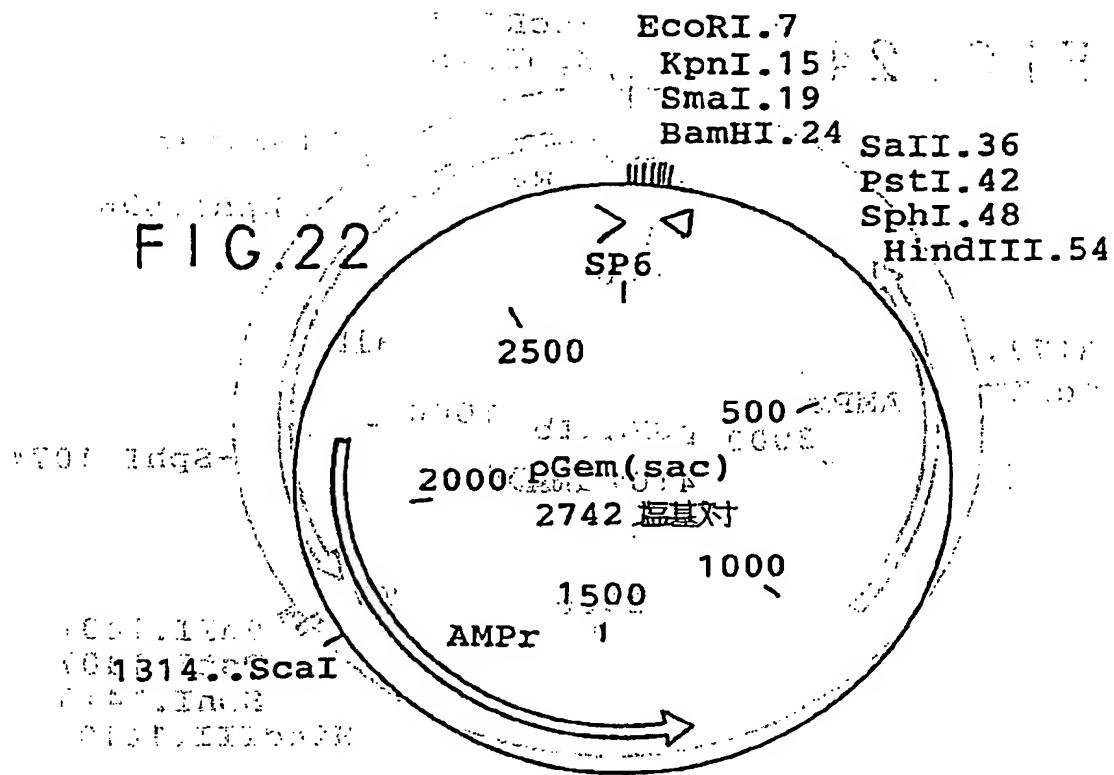
【図31】



【図21】

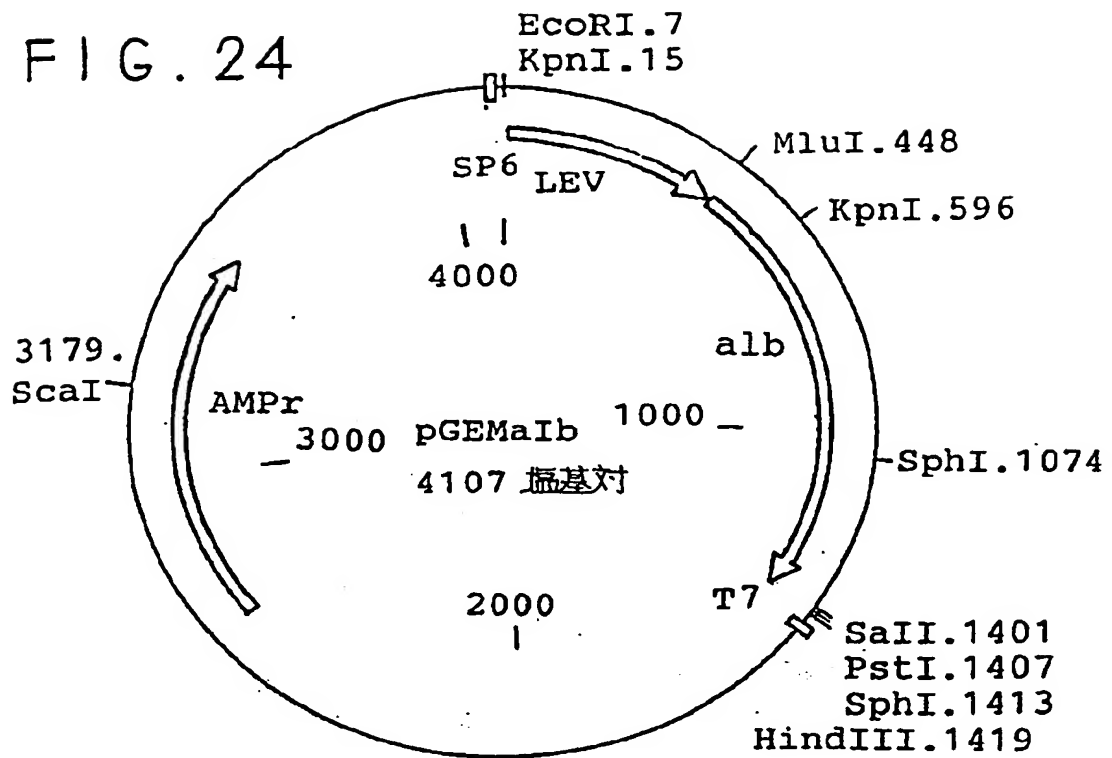


【図22】



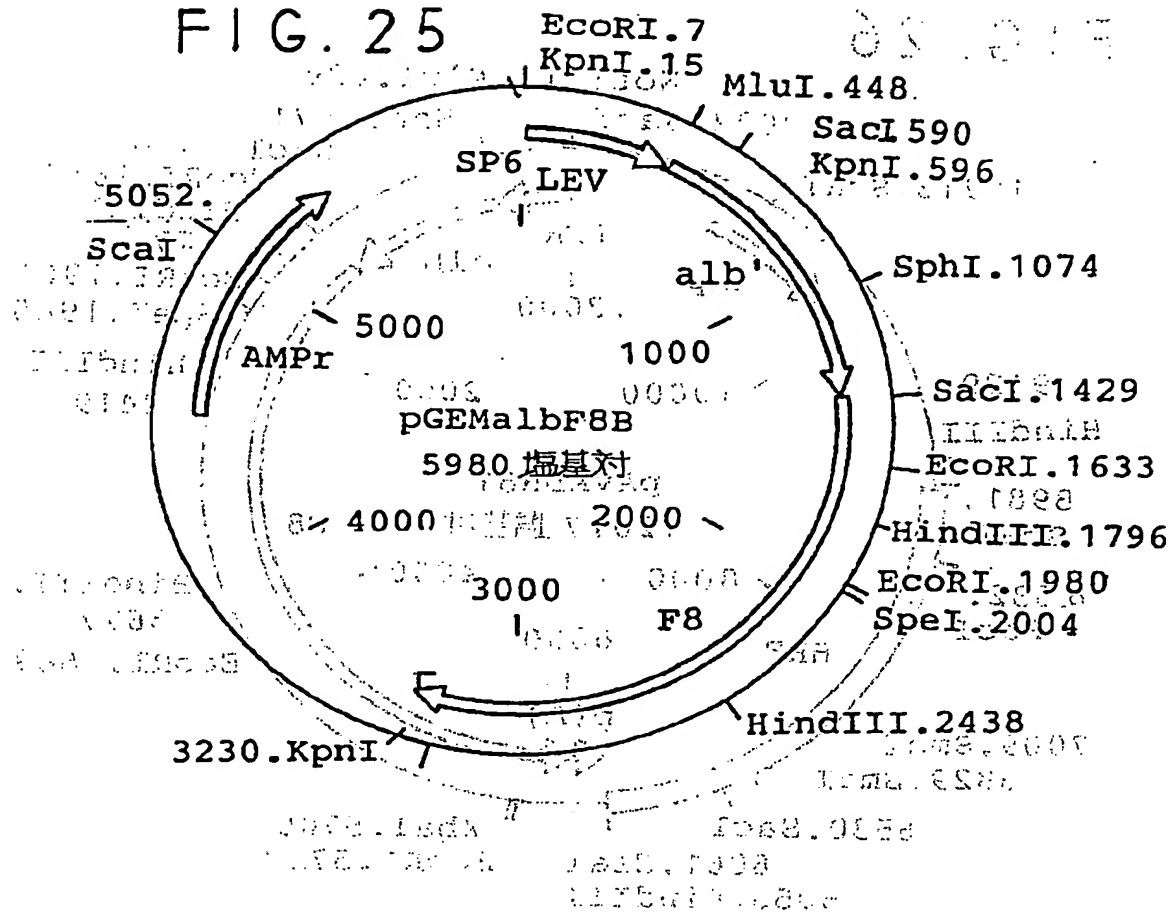
【図24】

FIG. 24



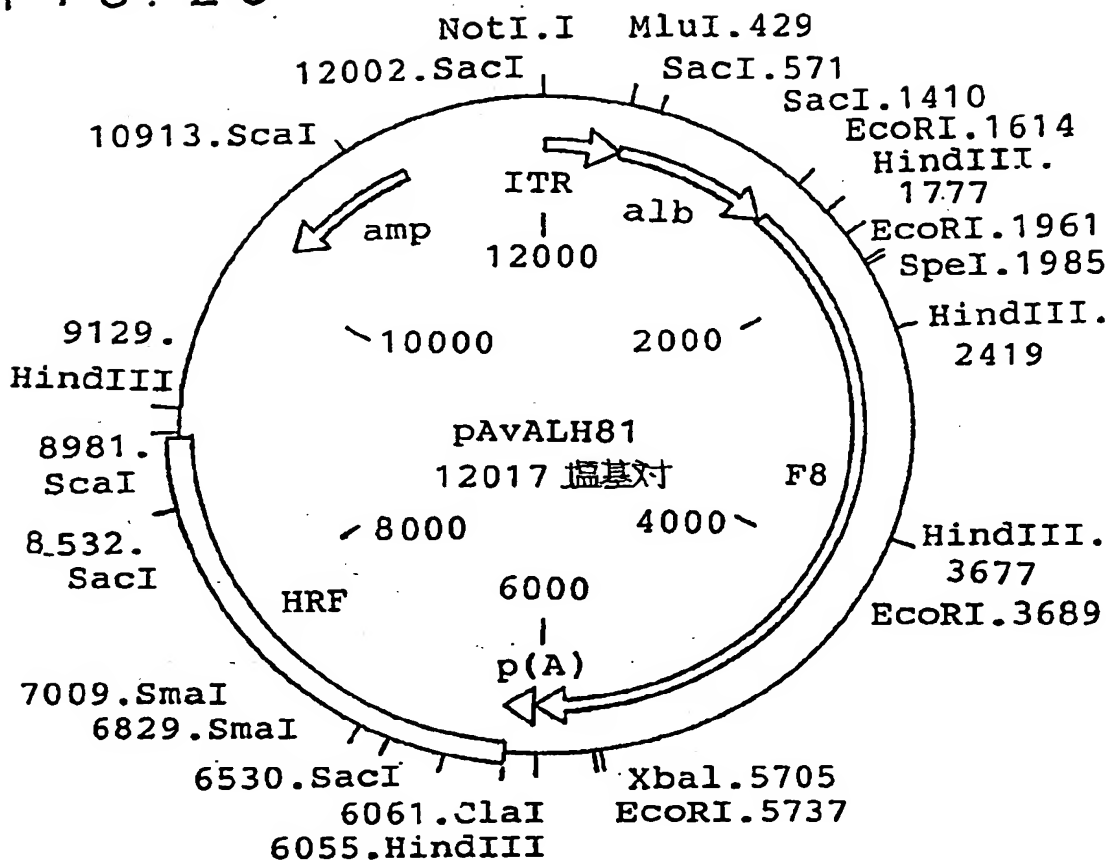
【图25】

FIG. 25



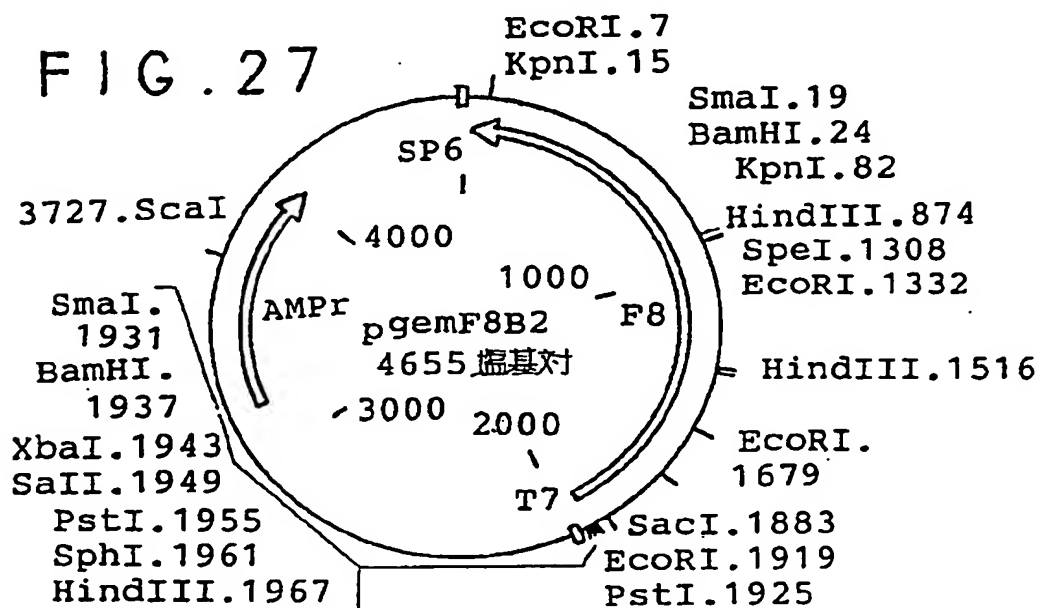
【图26】

FIG. 26



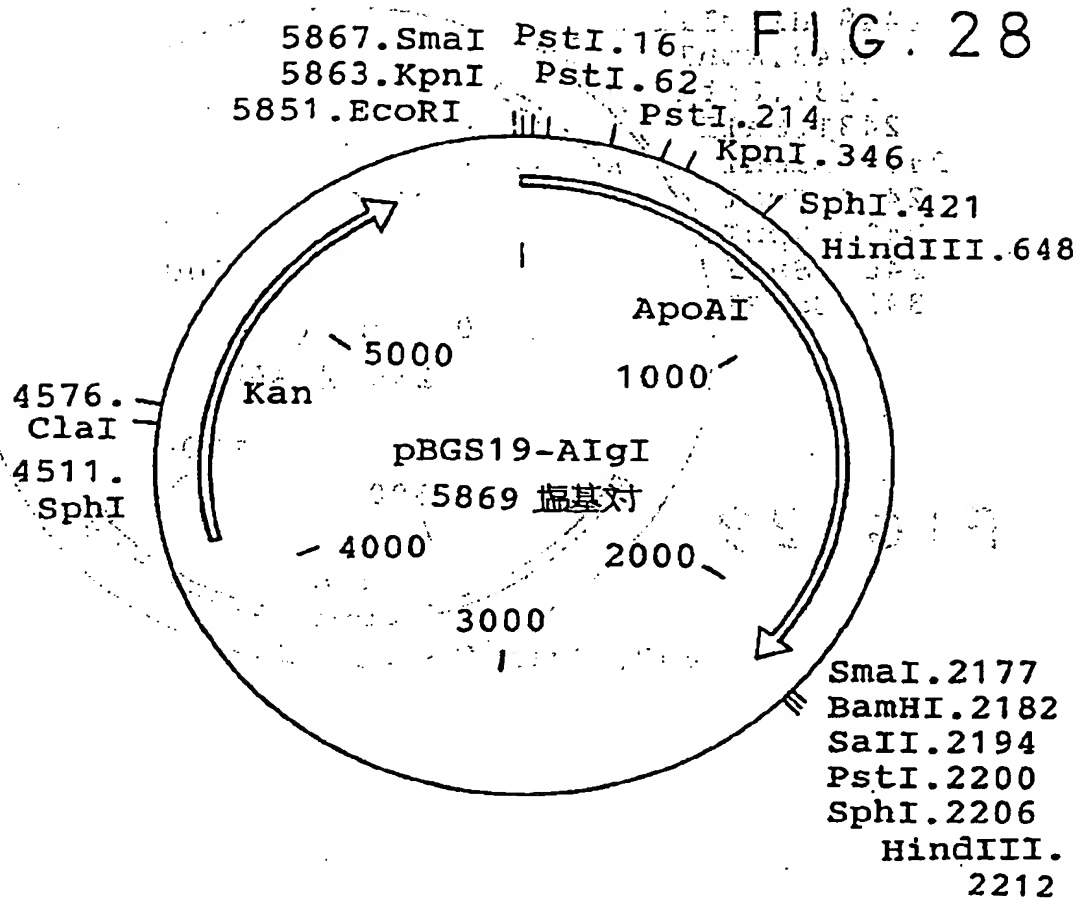
【图27】

FIG. 27





【図28】



【图29】

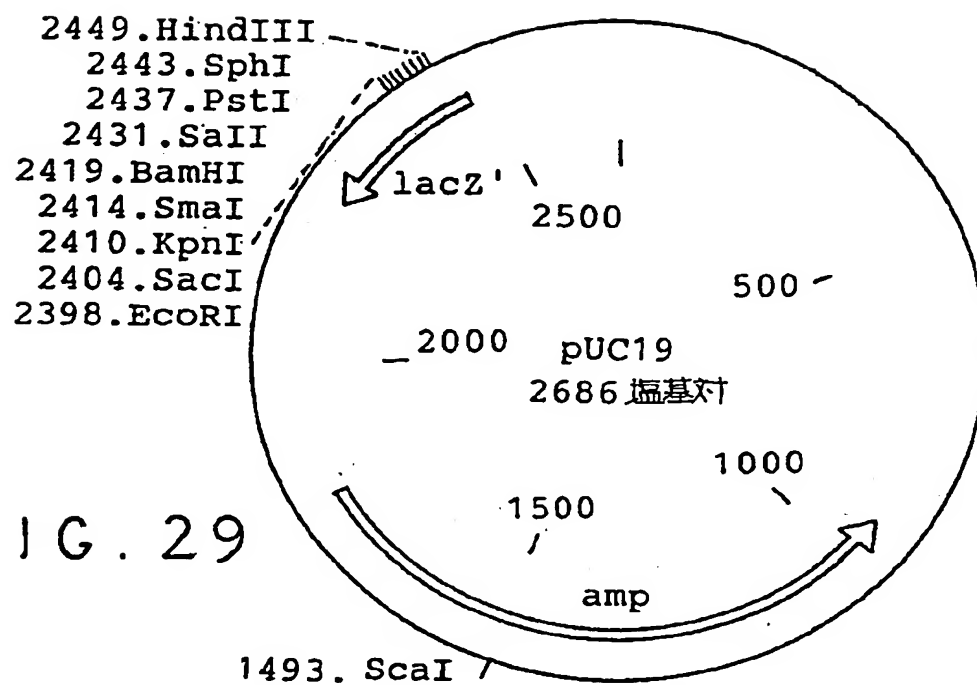
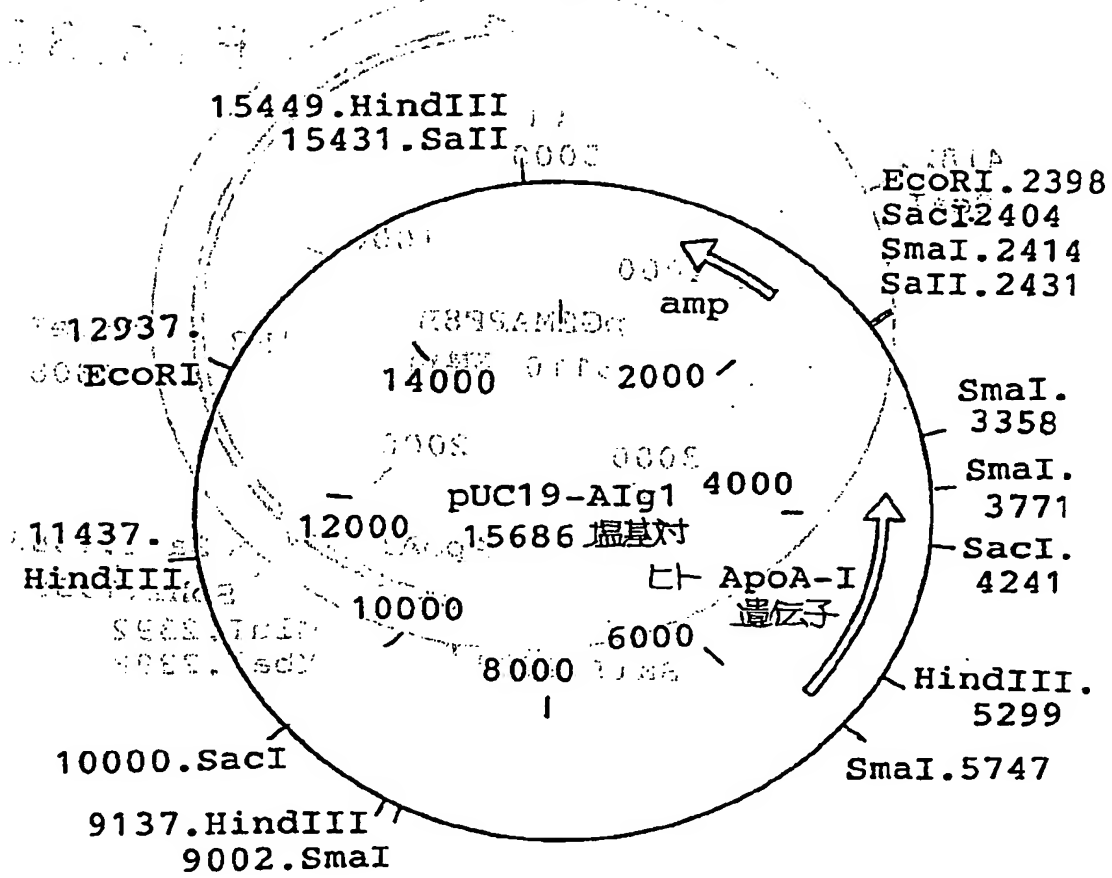


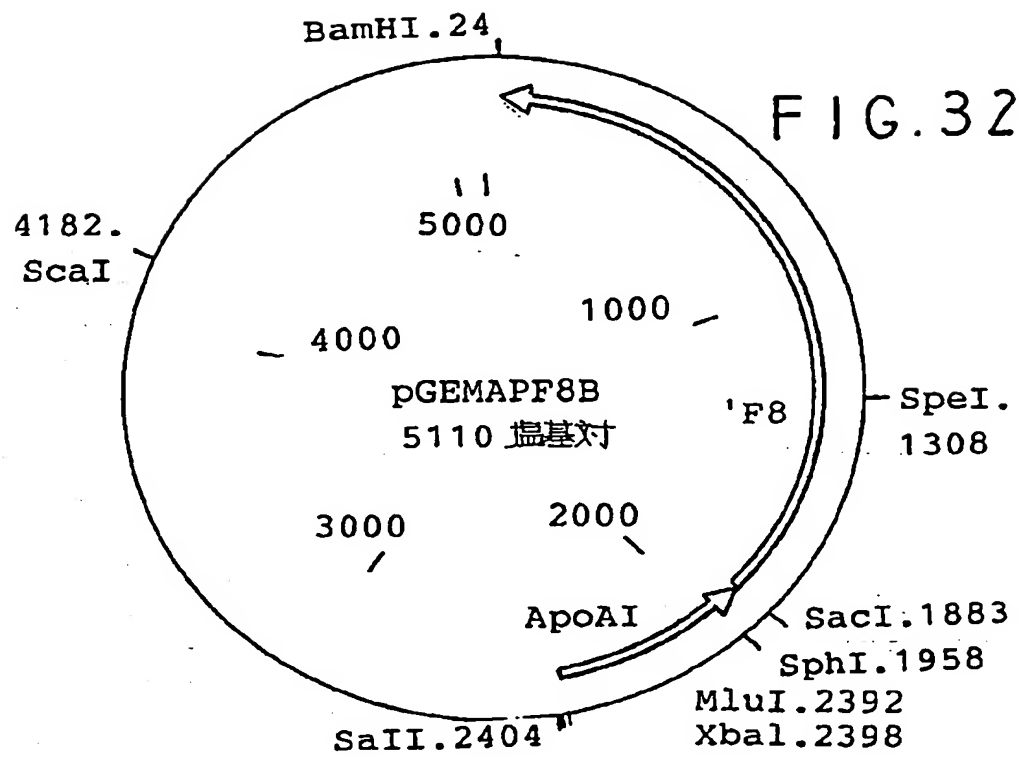
FIG. 29

【図30】

FIG. 30

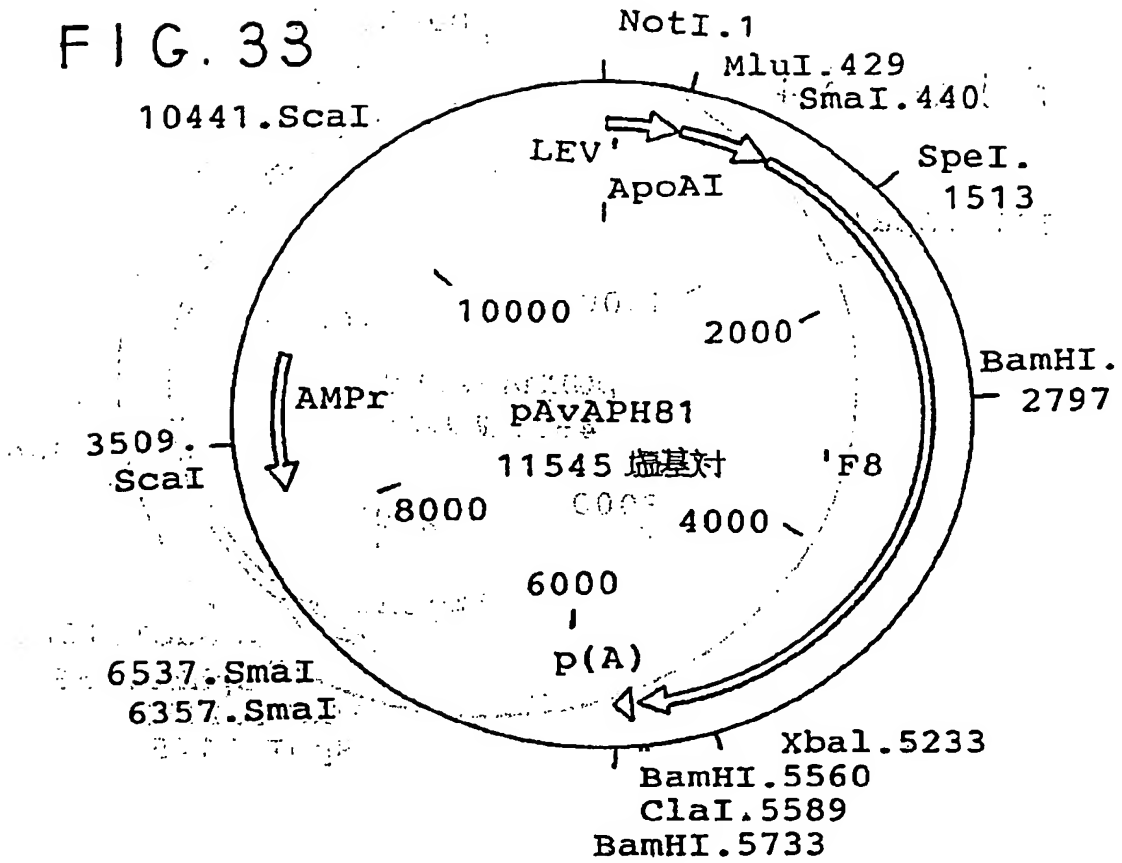


【図32】

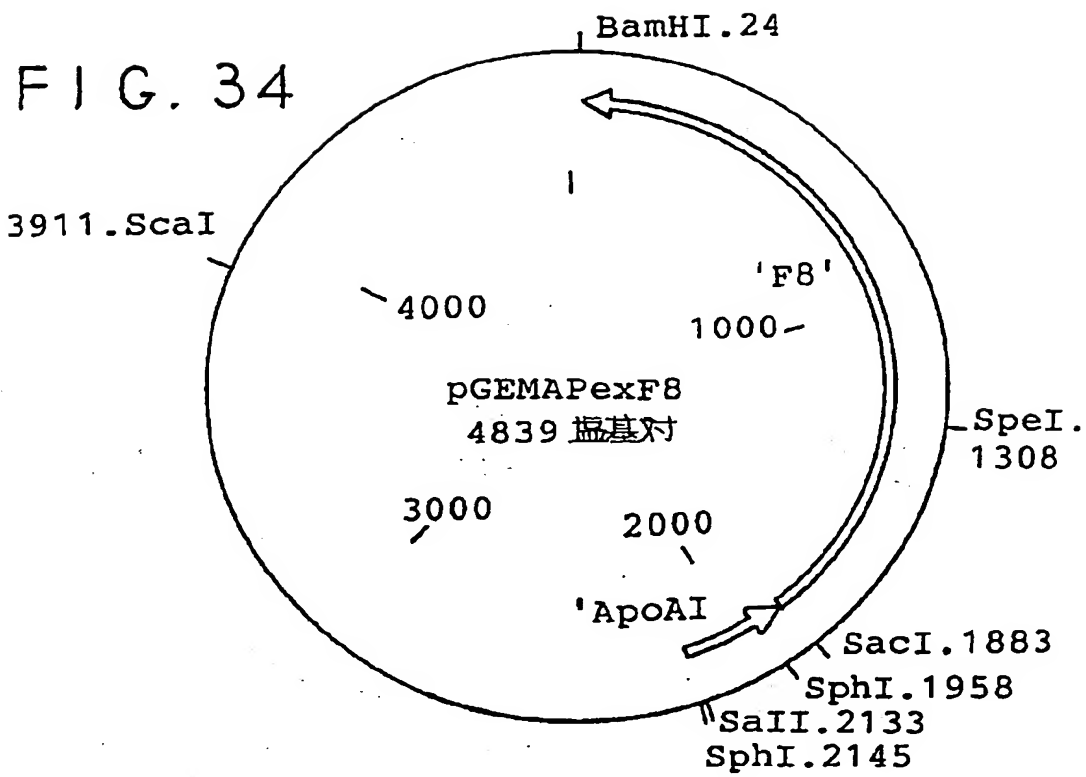


【図33】

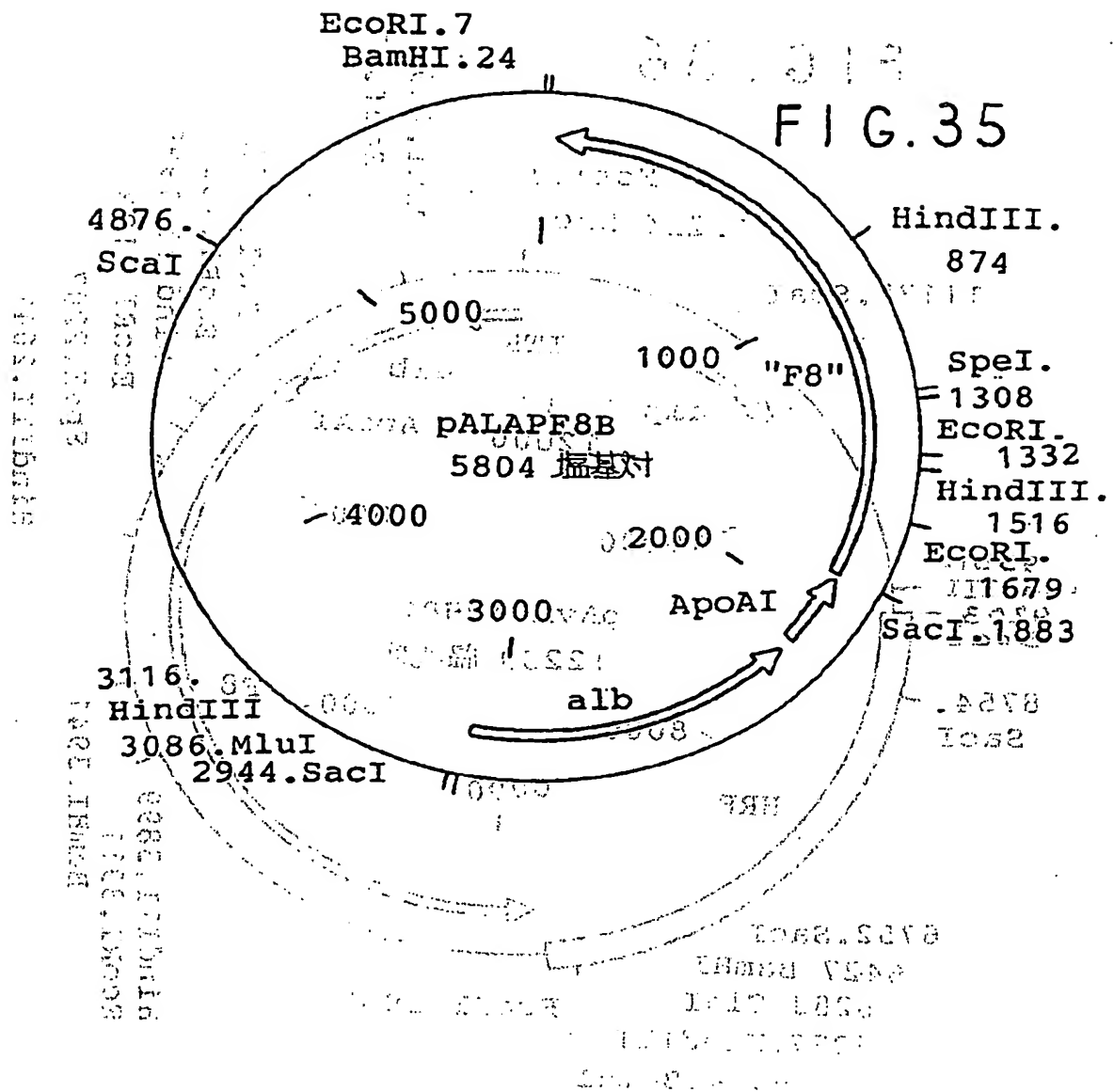
FIG. 33



【図34】

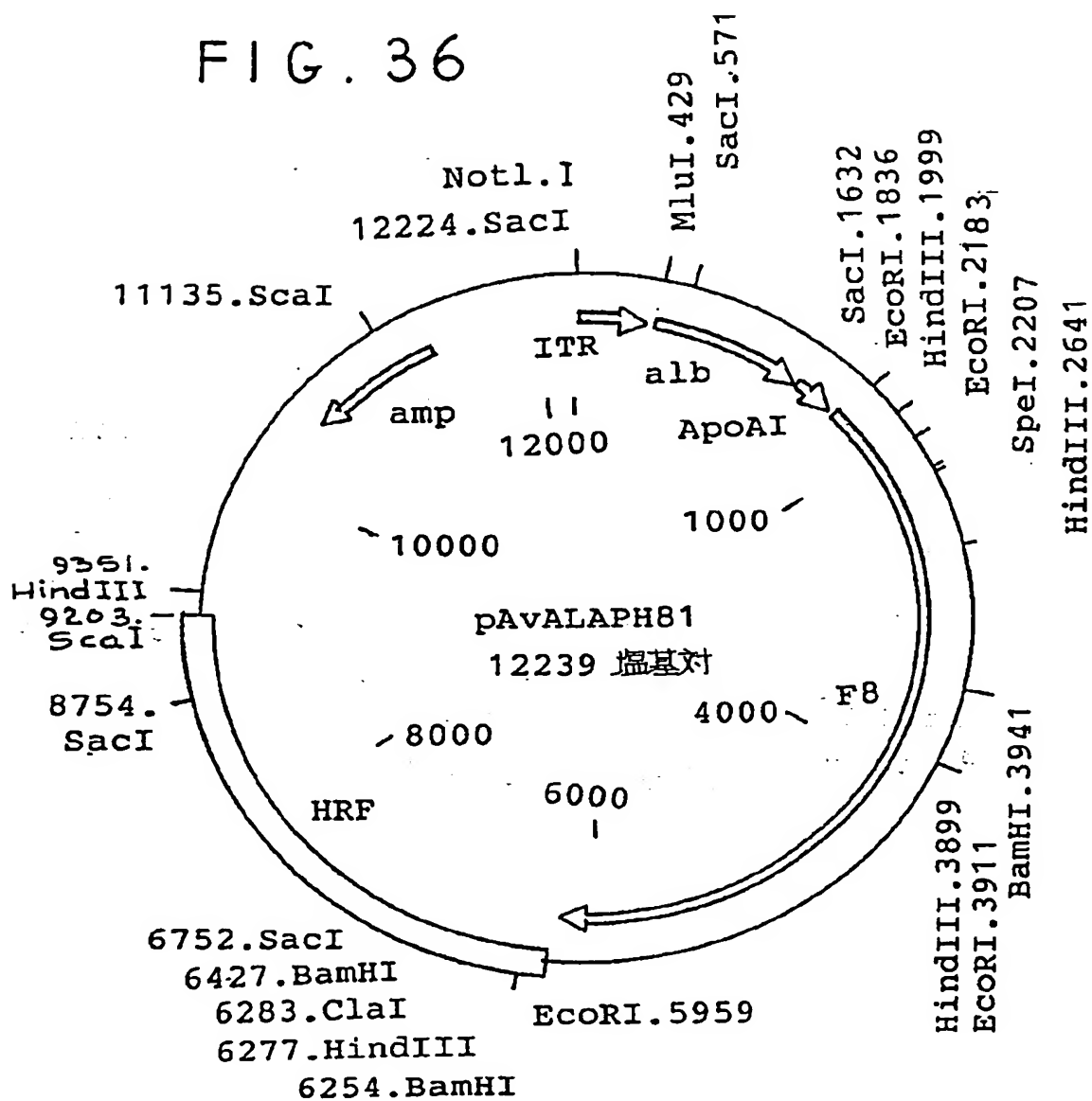


【图35】



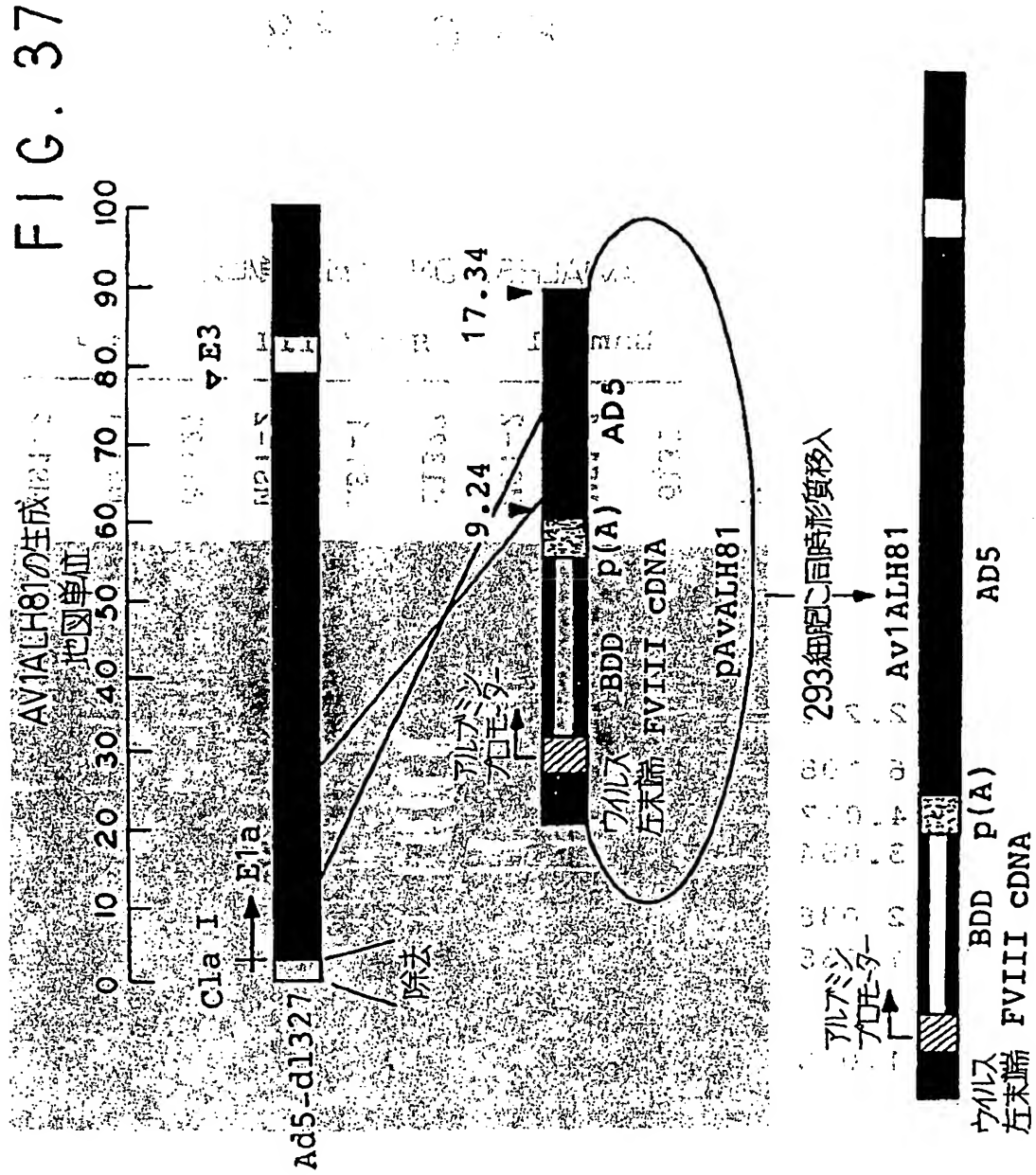
【图36】

FIG. 36



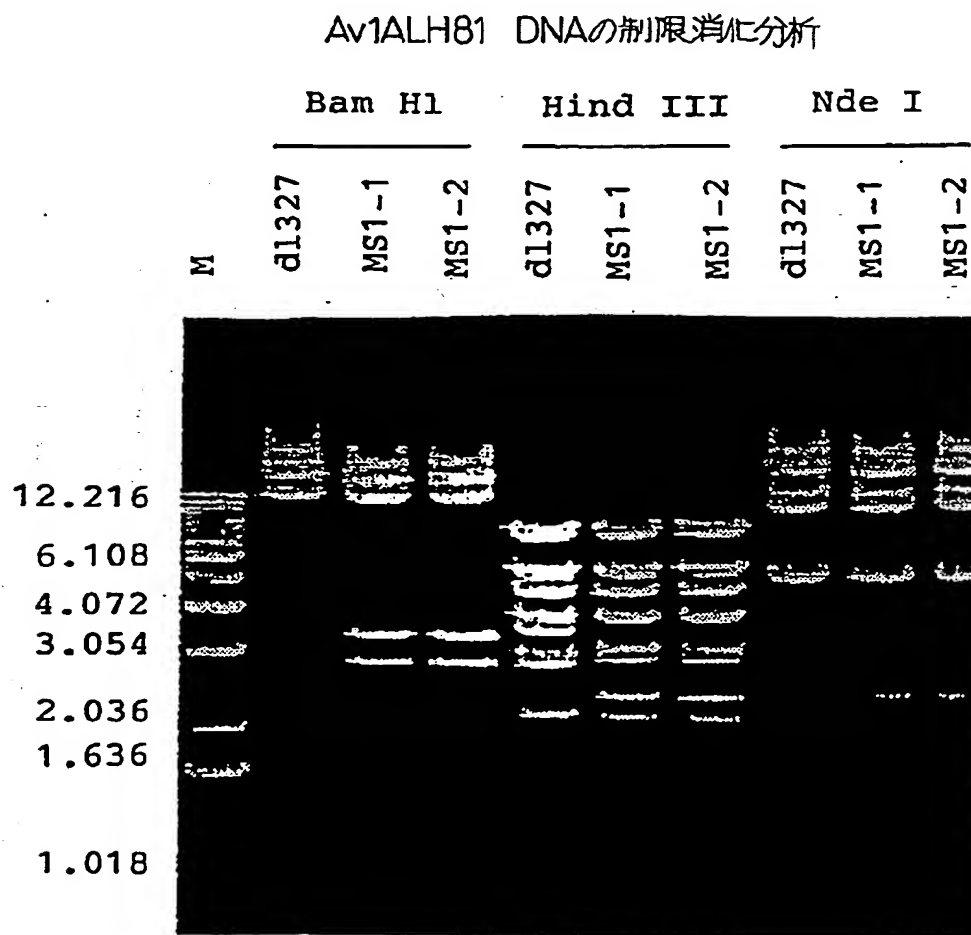


【図37】



【図38】

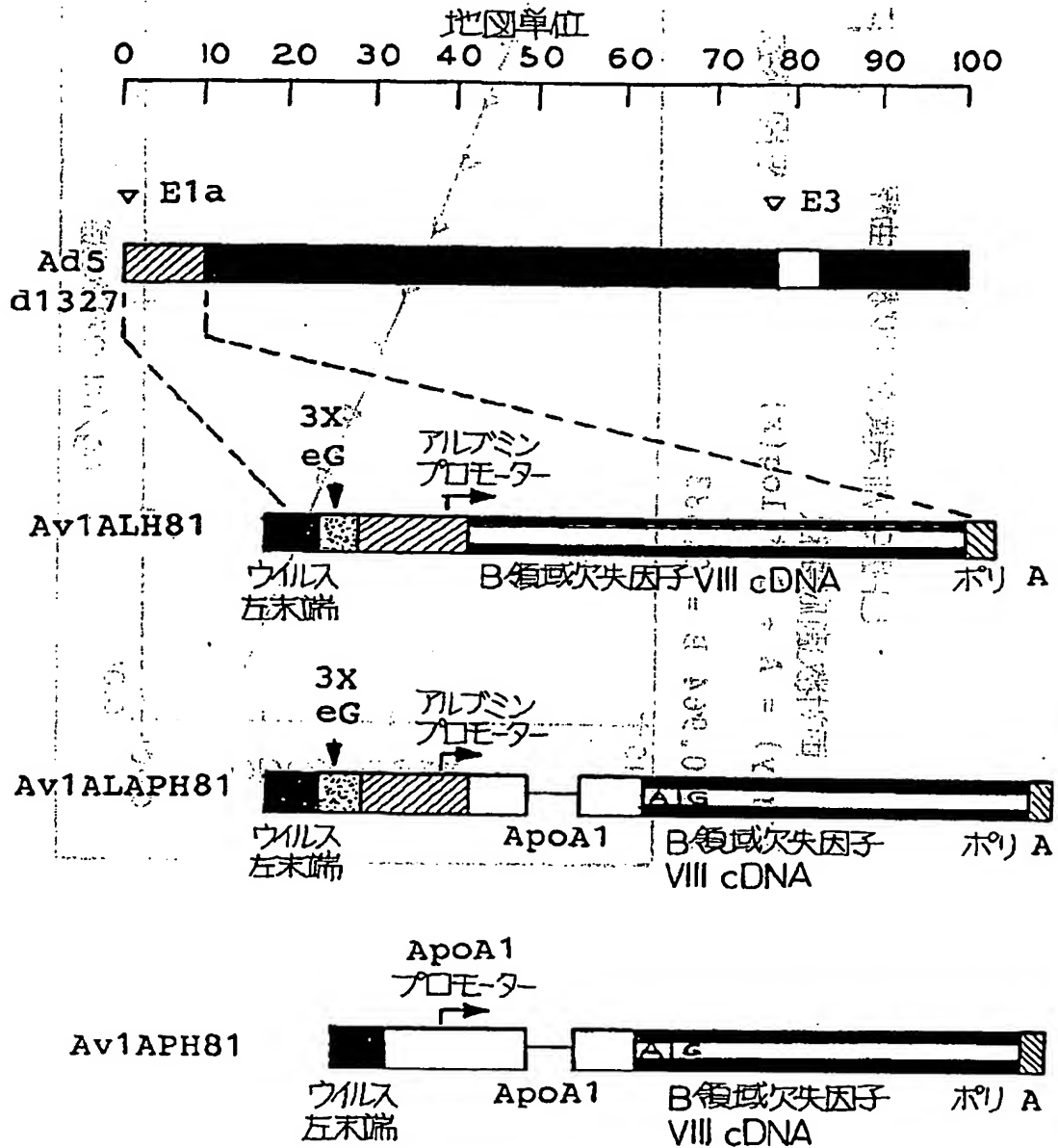
## FIG. 38



【図39】

## FIG. 39

因子 VIII アデノウイルスベクター

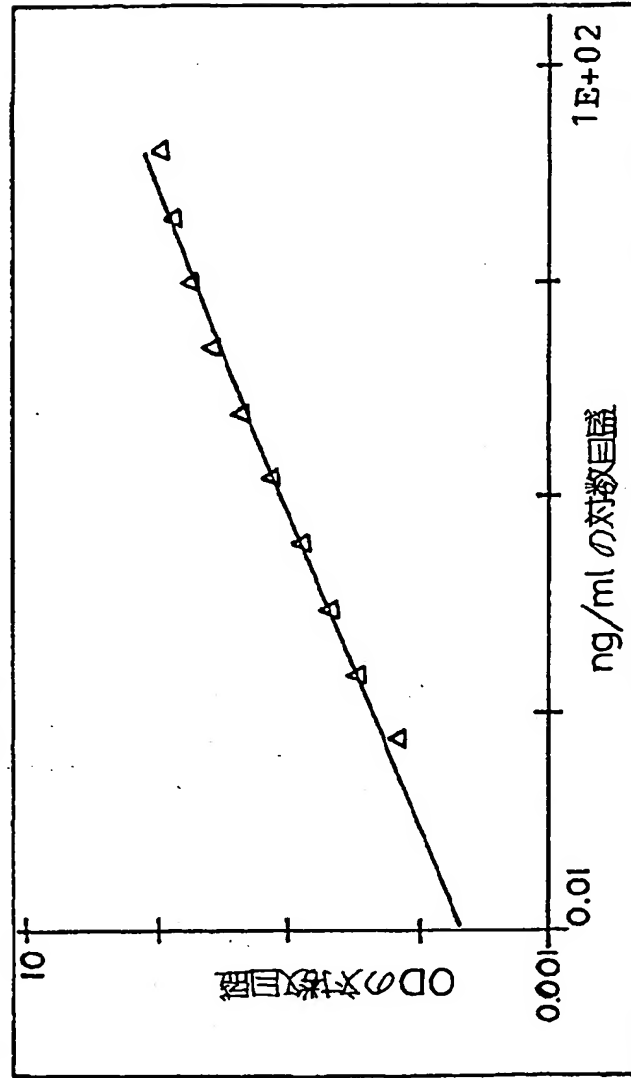


【図40】

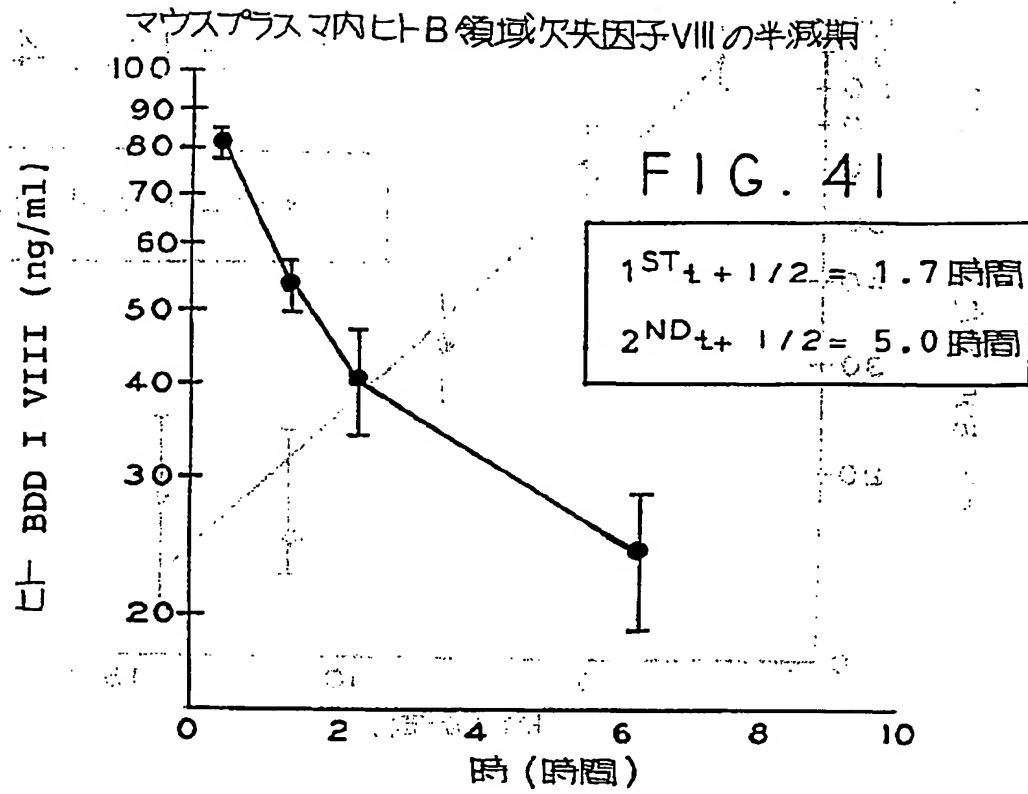
ヒト因子VIII特異的エリザ標準曲線  
 両対数適応曲線  
 $\log(y) = A + B * \log(x)$  相関係数: 0.993

FIG. 40

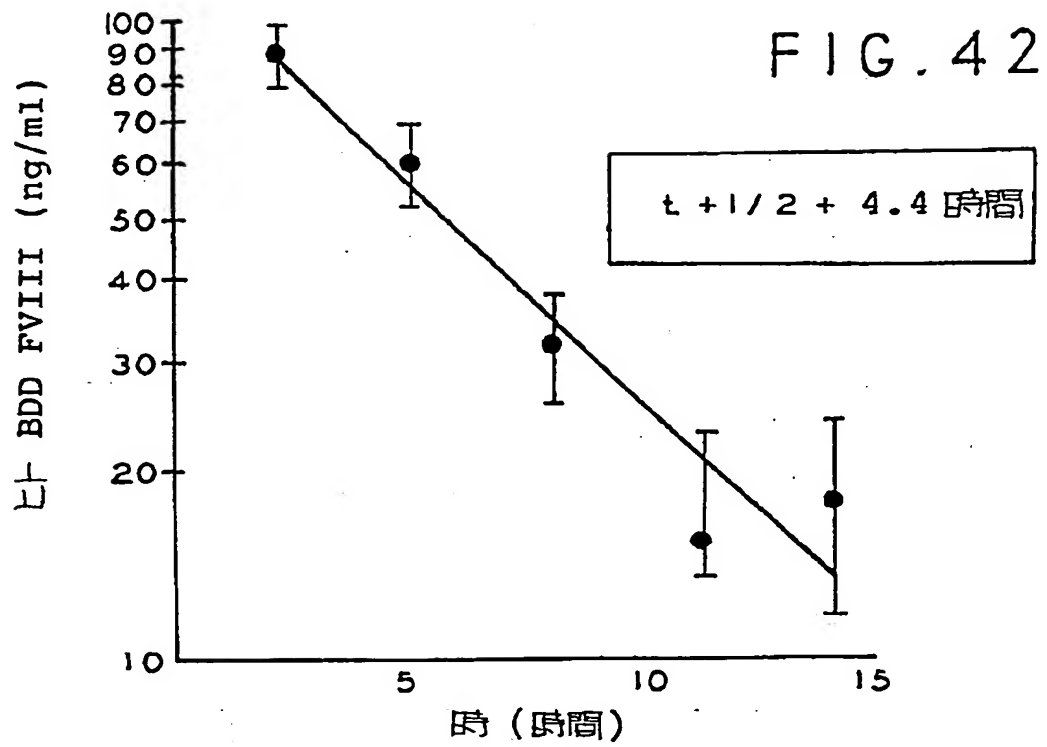
$$A = -0.964 \quad B = 0.683$$



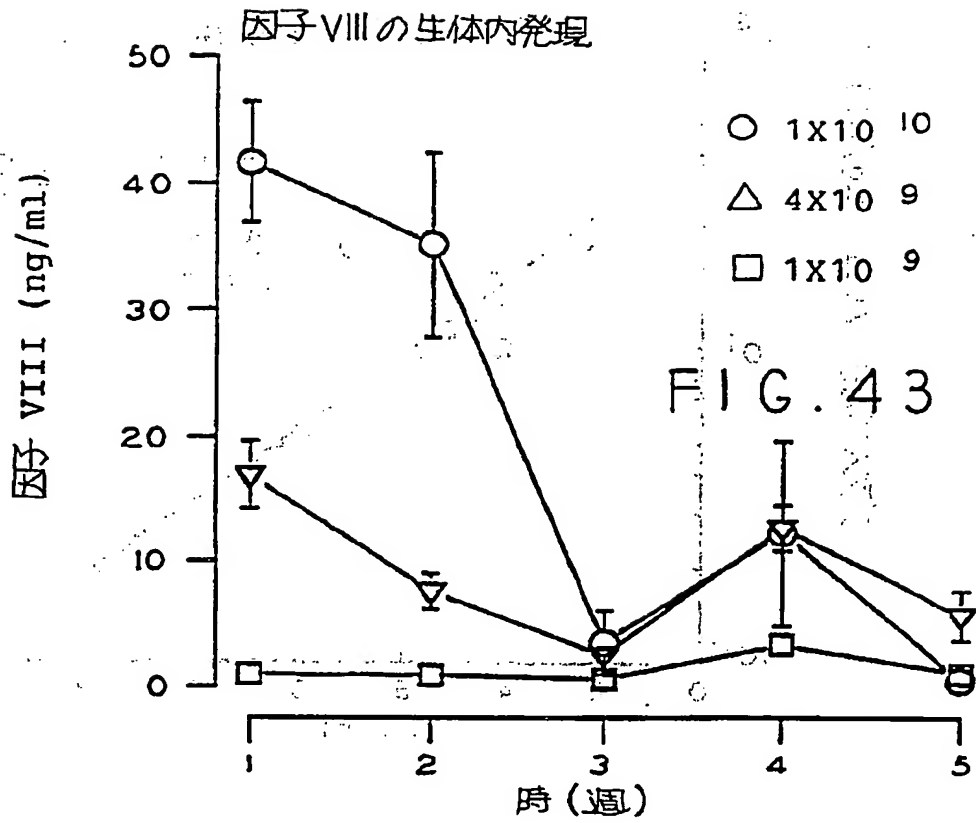
【図41】



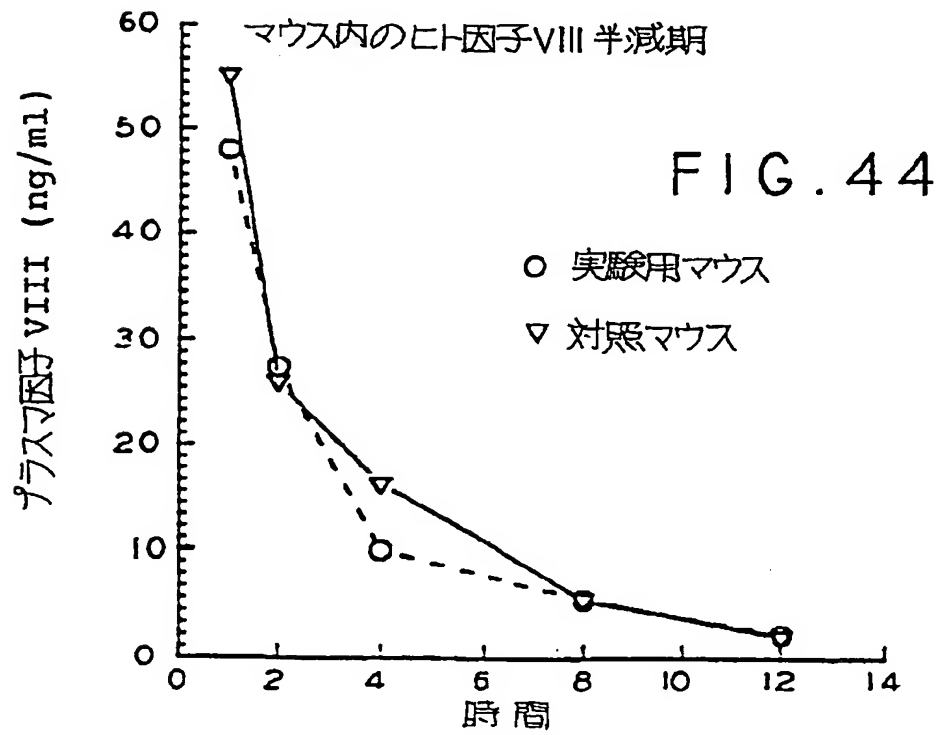
【図42】



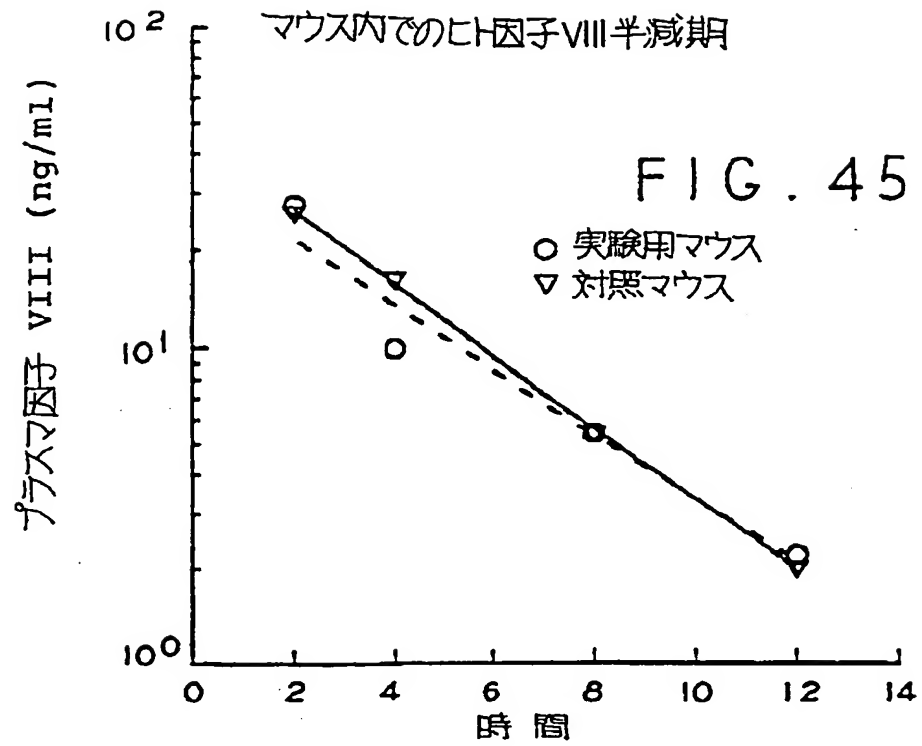
【図43】



【図44】

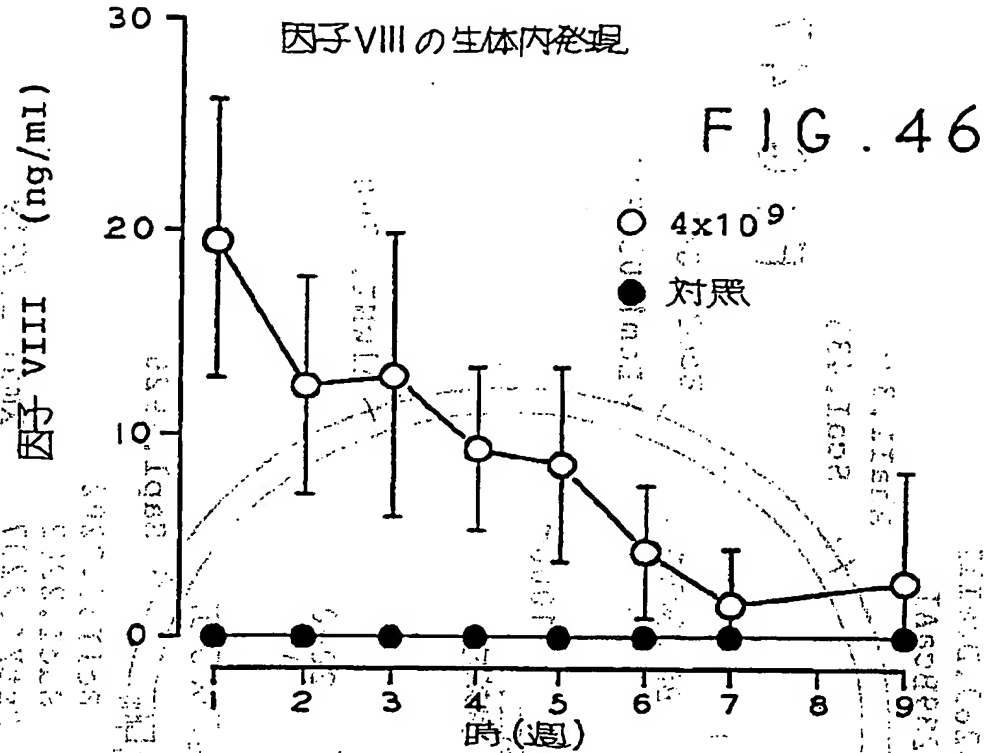


【図45】

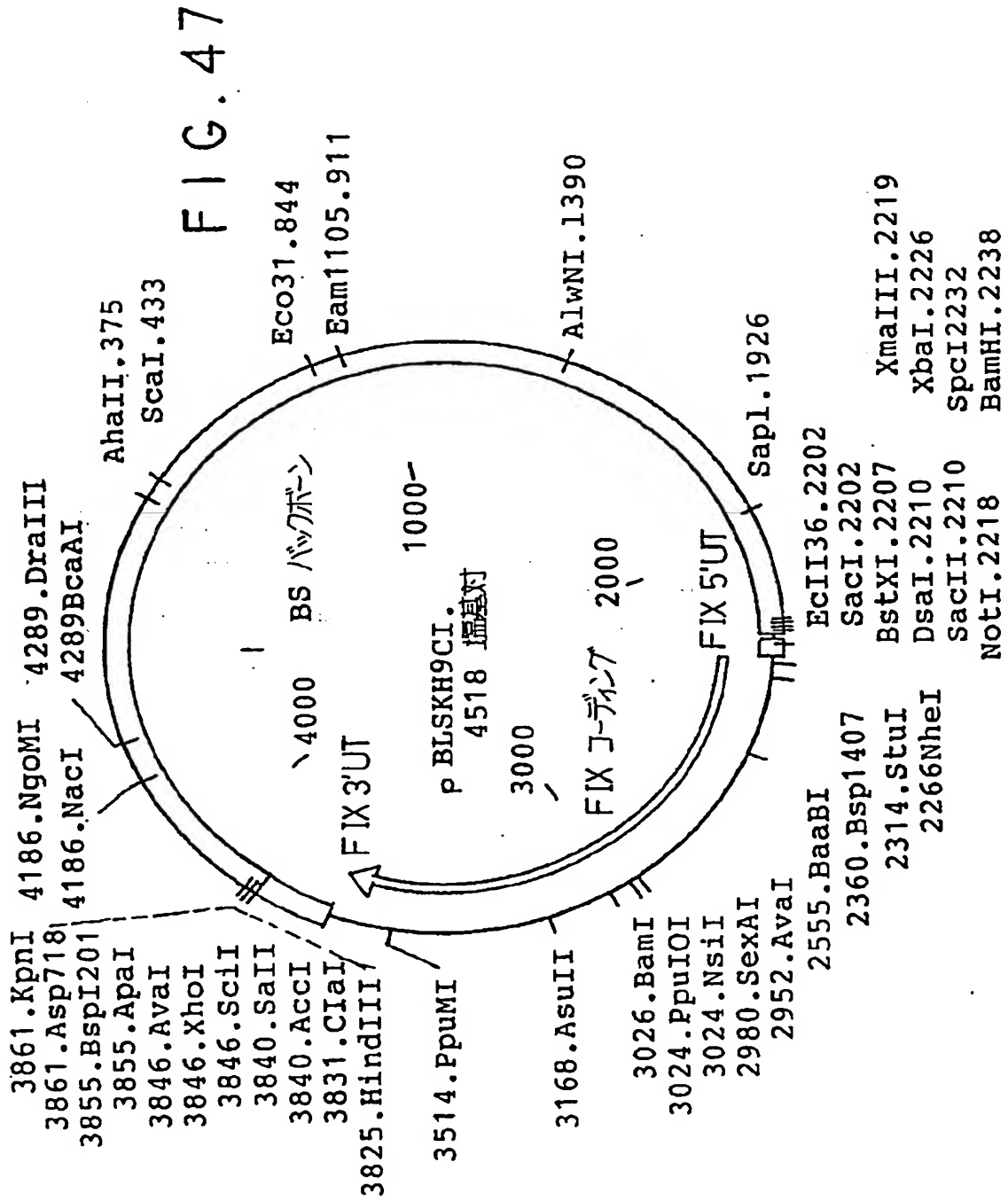




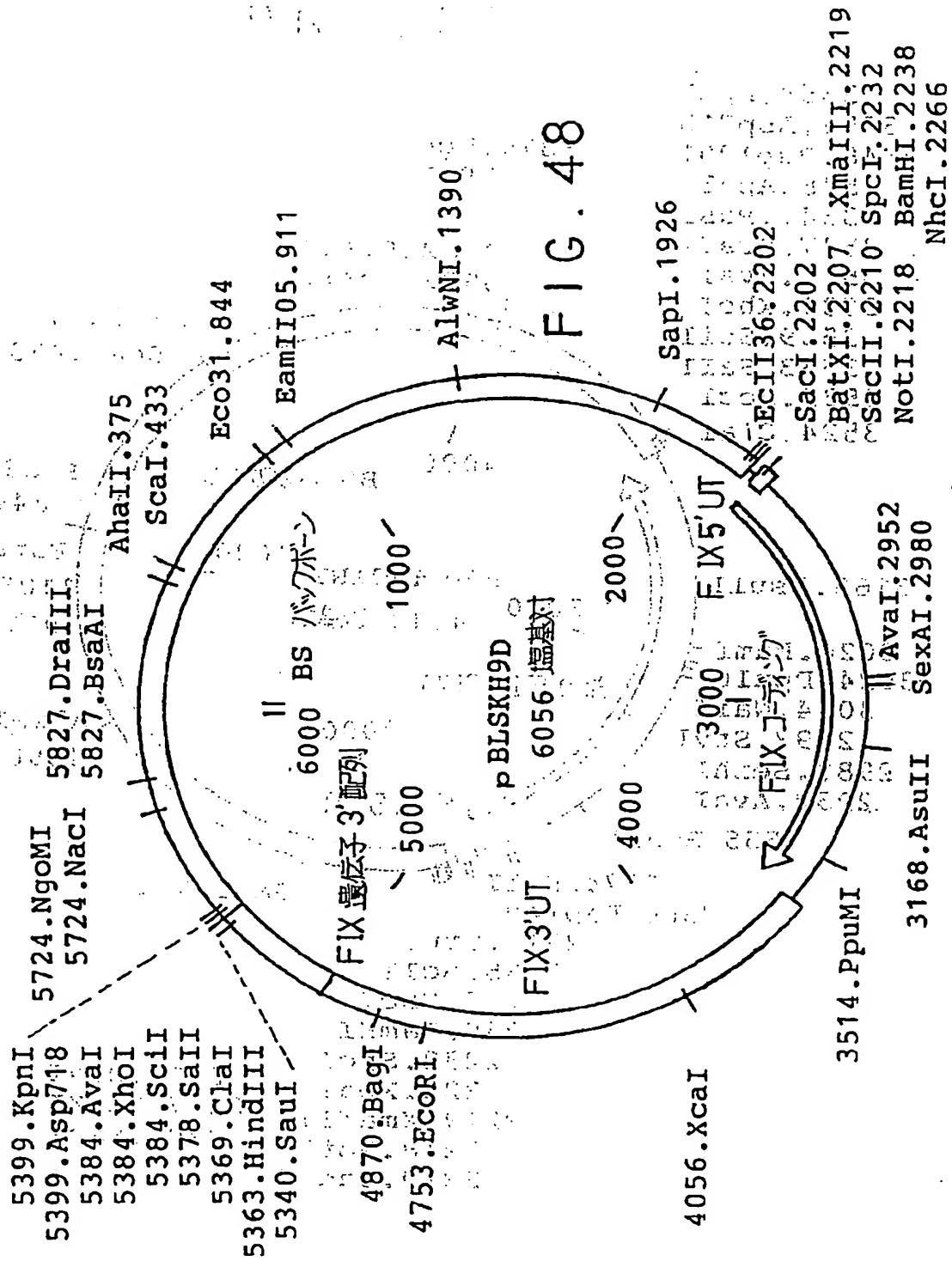
【図46】



【図47】

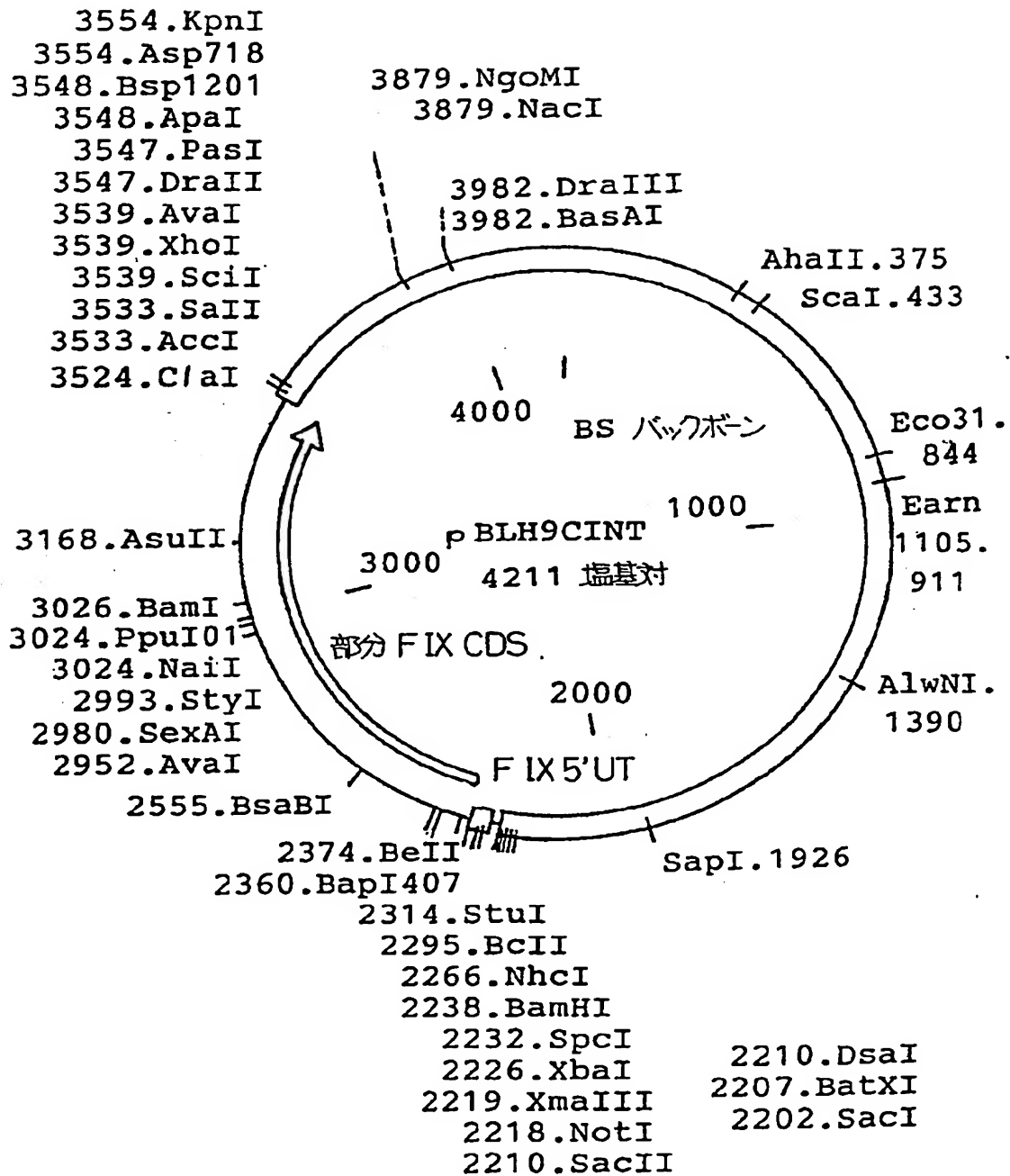


【図48】

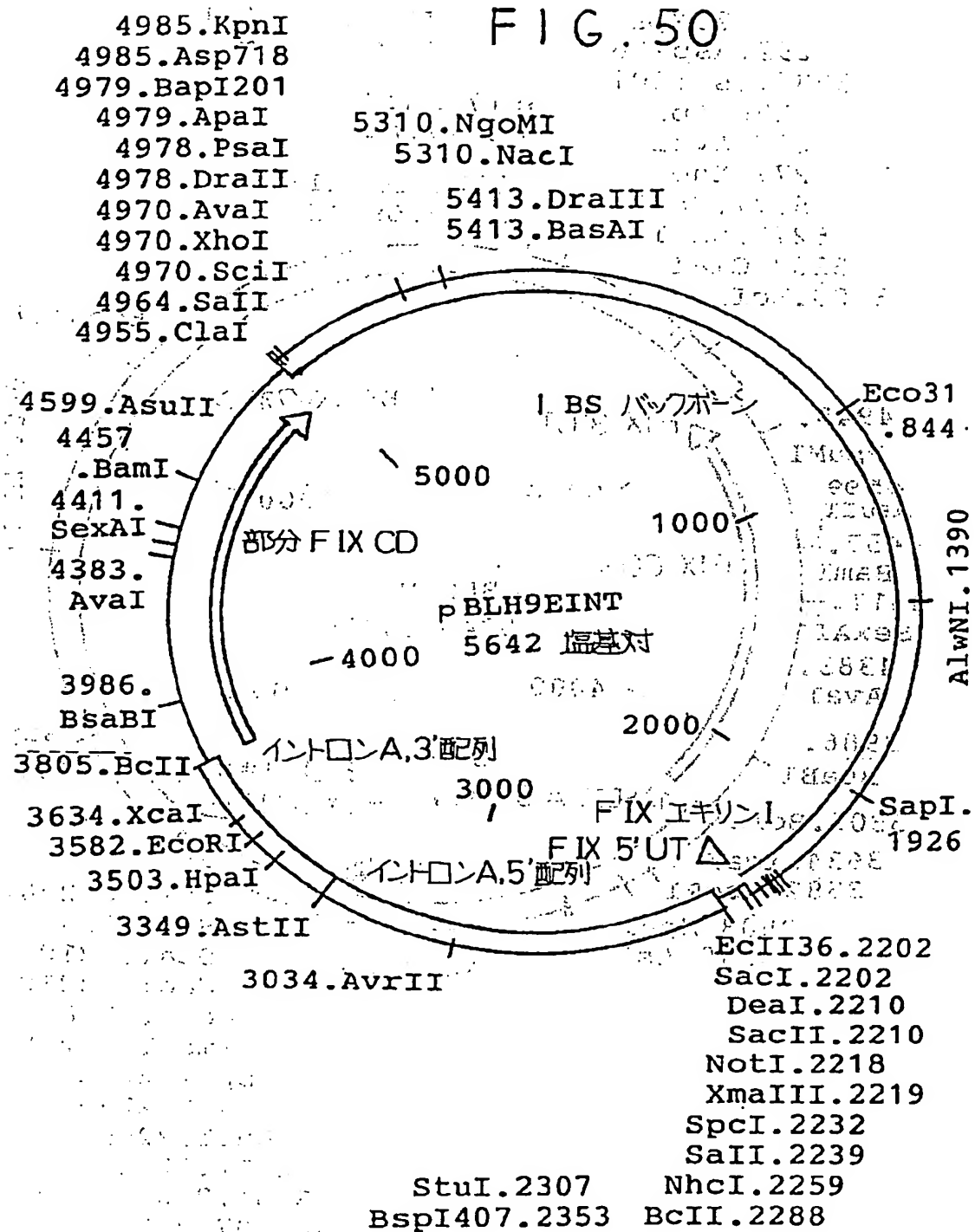


【図49】

FIG. 49

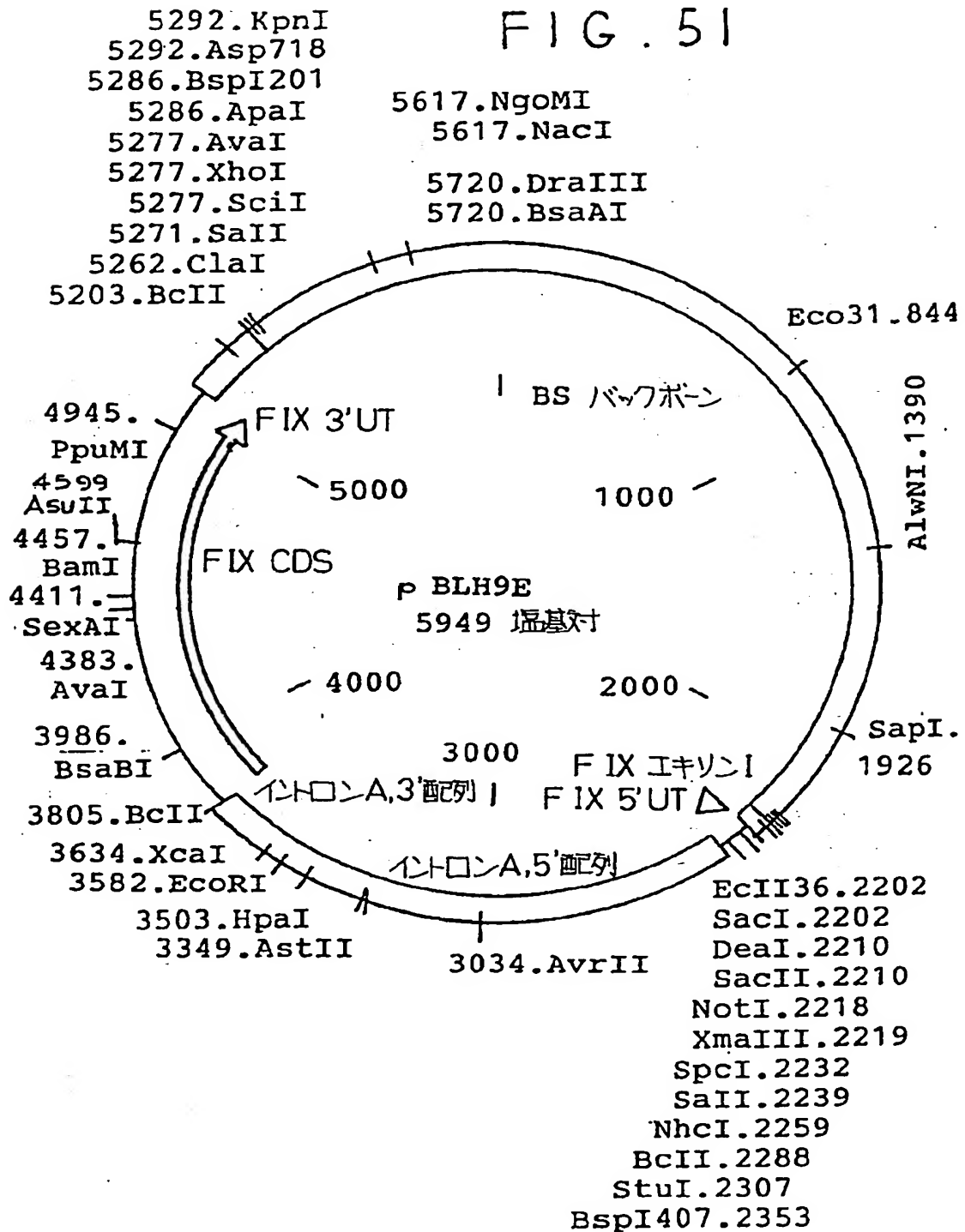


【図50】

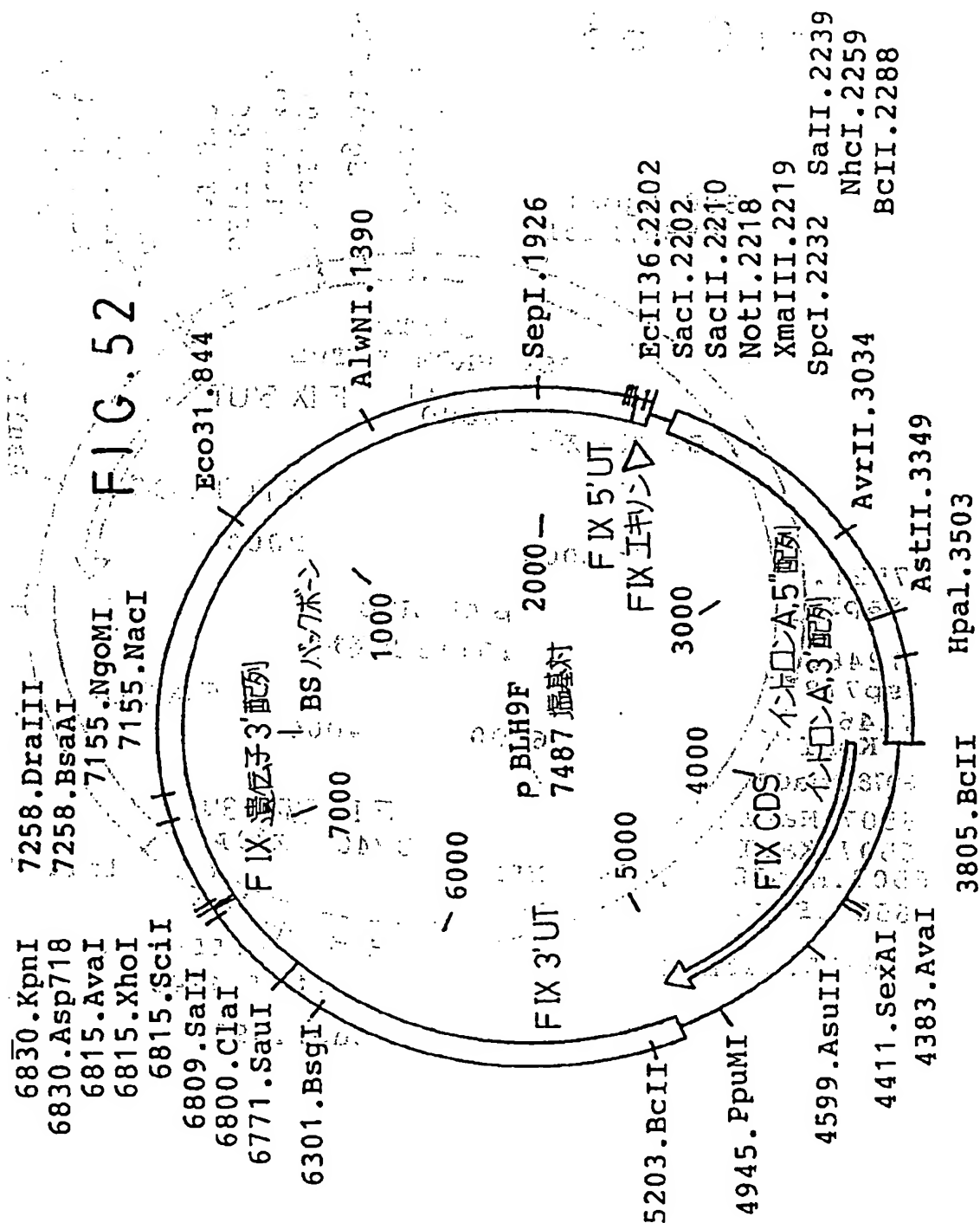


【図51】

FIG. 51

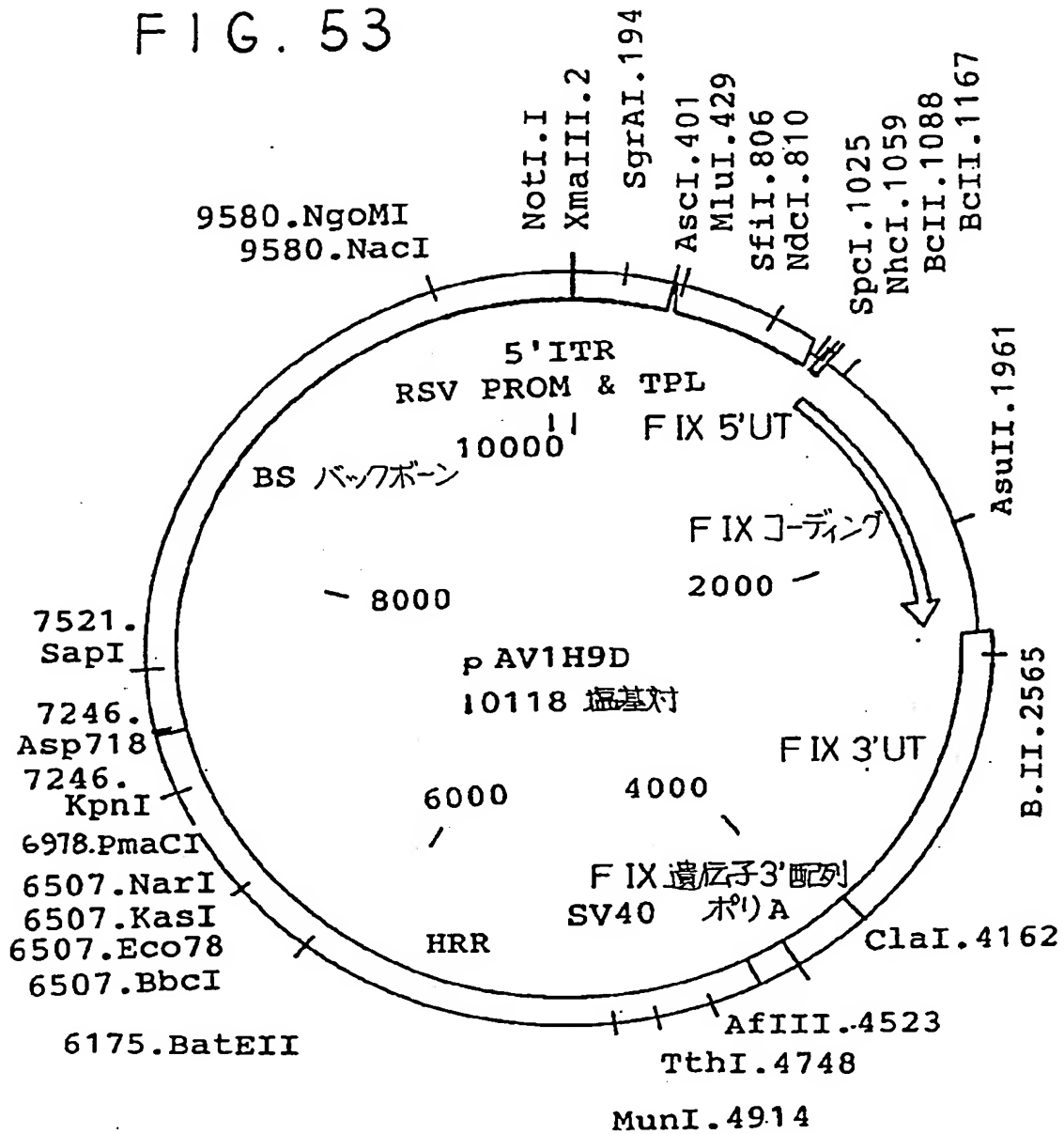


【図52】



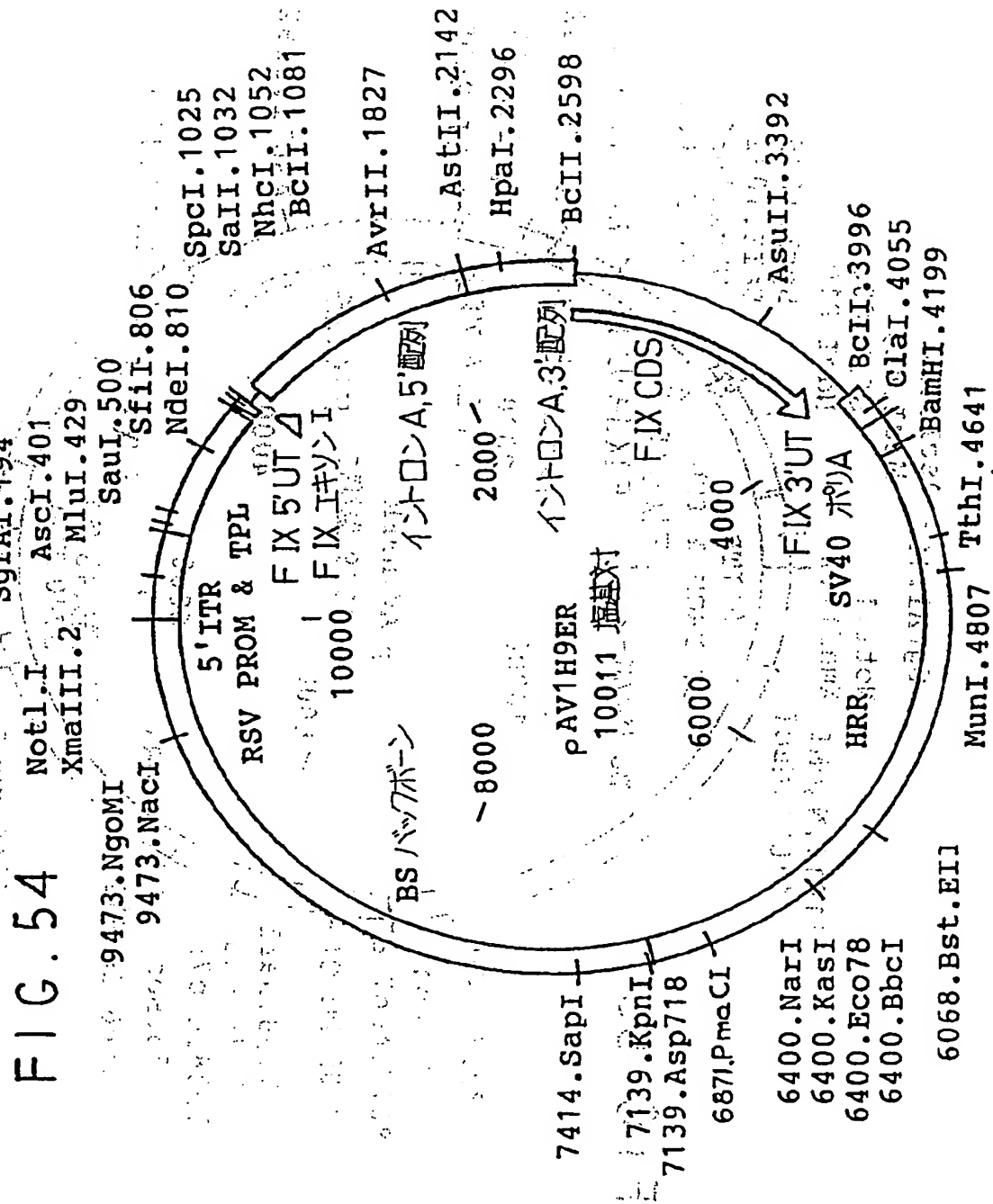
【図53】

FIG. 53

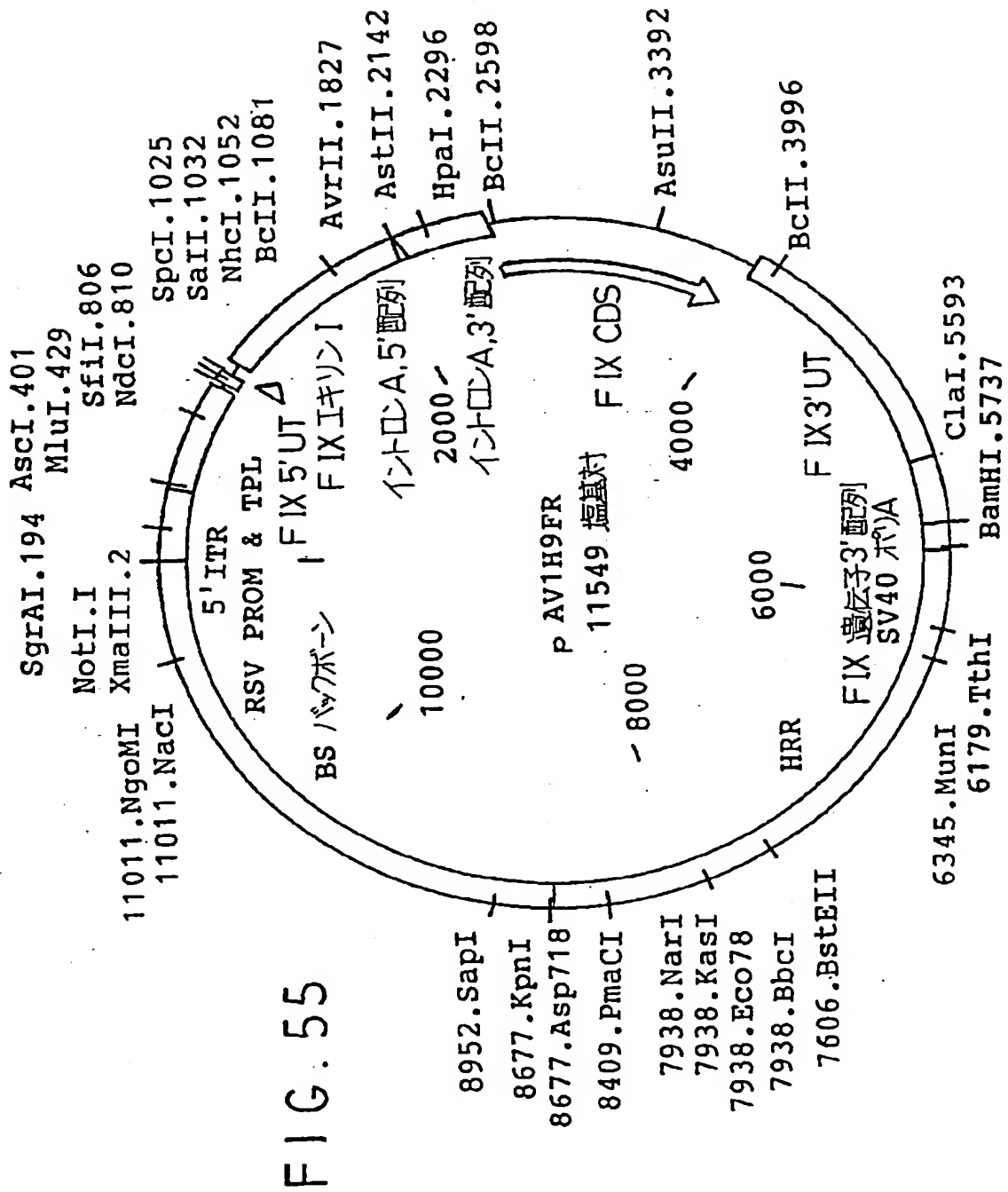




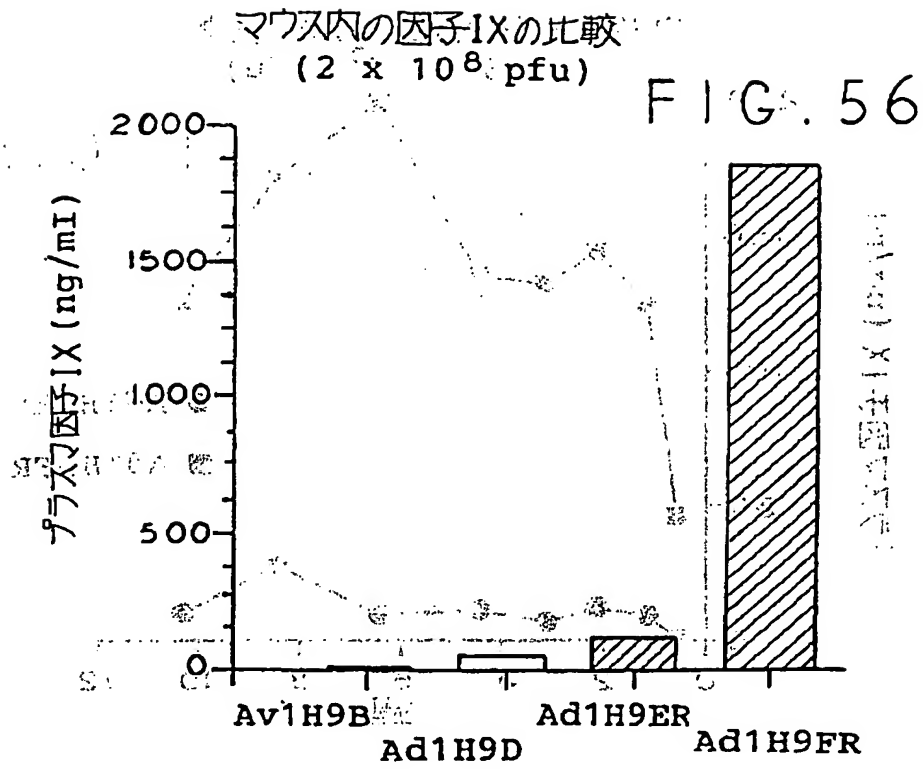
【図54】



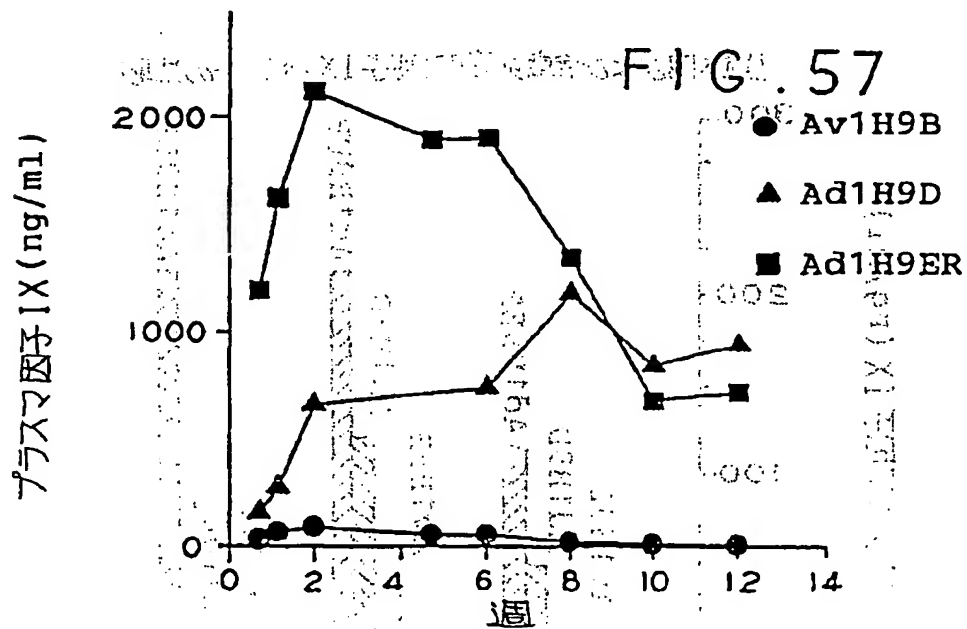
【図55】



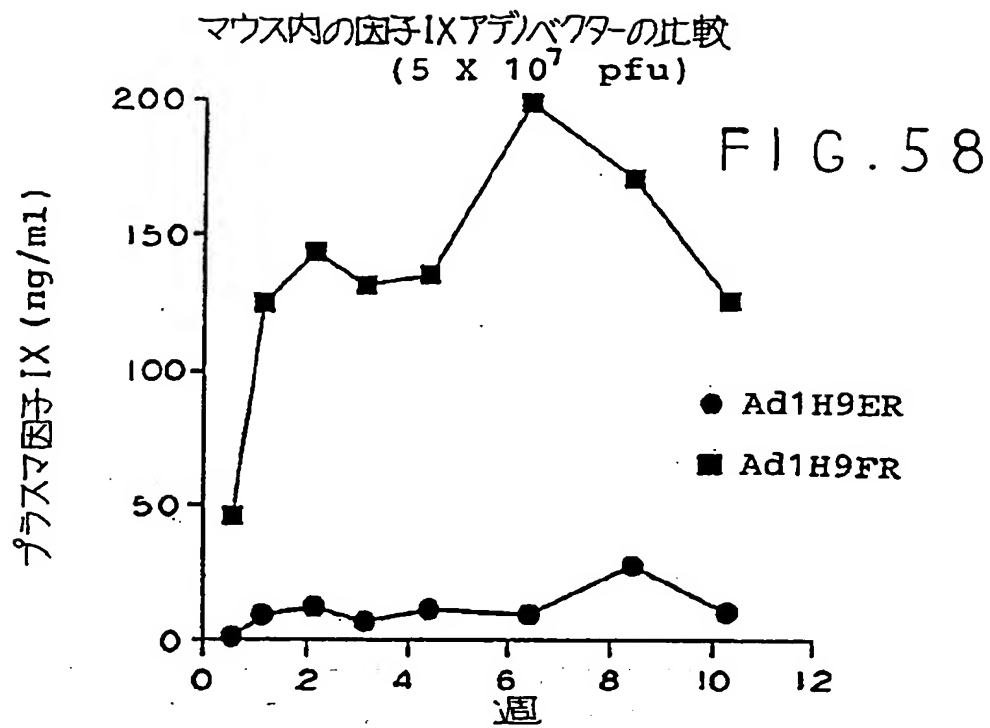
【図56】



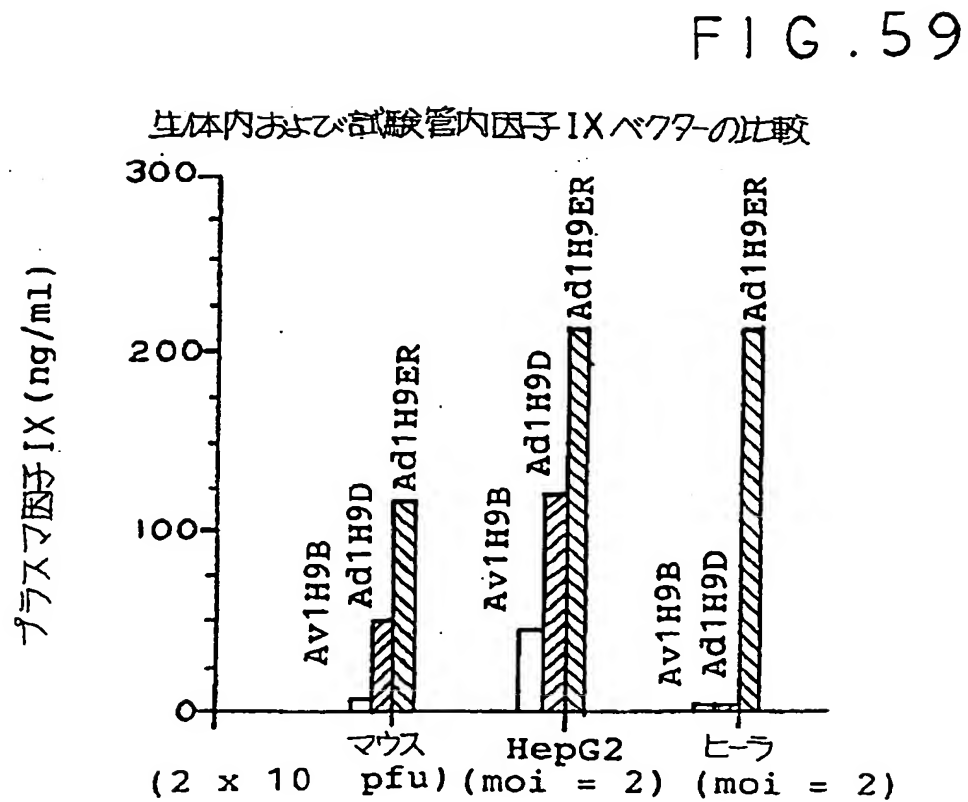
【図57】



【図58】



【図59】



## 【国際調査報告】

PCT/ISA/210

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/04075

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT-MATTER</b> IPC(3) : C12N 15/86; A61K 48/00 US CL : 435/320.1; 424/93A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/320.1; 424/93A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS; DIALOG DATABASES; BIOSIS PREVIEWS; MEDLINE; WORLD PATENT INDEX; CA SEARCH		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 93/03769 (CRYSTAL) 04 March 1993, see entire document.	1-20
Y	Blood, Volume 76, Number 2, issued 15 July 1990, Miller, "Progress Toward Human Gene Therapy," pages 271-278, see entire article.	1-20
Y	Bone Marrow Transplantation, Volume 9, Supplement 1, issued 1992, Stratford-Perricaudet et al., "Feasibility of adenovirus-mediated gene transfer <i>in vitro</i> ," pages 151-152, see entire article.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 JULY 1994		AUG 09 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer
Facsimile No. (703) 305-3230		JOHNNY F. RAILEY II, PH.D. <i>[Signature]</i>
		Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/04075

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Human Gene Therapy, Volume 4, Number 2, issued April 1993, Hoeben et al., "Toward Gene Therapy for Hemophilia A: Long-Term Persistence of Factor VIII-Secreting Fibroblasts after Transplantation into Immunodeficient Mice," pages 179-186, see entire article.	1-20
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Volume 87, issued August 1990, Armentano et al., "Expression of human factor IX in rabbit hepatocytes by retrovirus-mediated gene transfer: Potential for gene therapy of hemophilia B," pages 6141-6145, see entire article.	1-20
Y	Blood, Volume 73, Number 2, issued February 1989, Palmer et al., "Production of Human Factor IX in Animals by Genetically Modified Skin Fibroblasts: Potential Therapy for Hemophilia B," pages 438-445, see entire article.	1-20
Y	Blood, Volume 75, Number 5, issued 01 March 1990, Israel et al., "Retroviral-Mediated Transfer and Amplification of a Functional Human Factor VIII Gene," pages 1074-1080, see entire article.	1-20
Y	Clinical Research, Volume 41, Number 2, issued April 1993, Kopfler et al., "Adenovirus-Mediated Human Apolipoprotein A1 Transfer Increases Circulating HDL Cholesterol in Mice," page 211A, see the abstract.	16-19

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI		
C 1 2 P 21/02		9281-4B	C 1 2 N 5/00		B
//(C 1 2 N 15/09	ZNA				
C 1 2 R 1:92)					
(C 1 2 P 21/02					
C 1 2 R 1:91)					
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, DE,				
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M					
C, NL, PT, SE), CA, JP					
(72) 発明者	カレコ, マイケル				
	アメリカ合衆国, 20854 メリーランド,				
	ロックヴィル, ハースストーン コート				
	8				
(72) 発明者	スミス, セオドア				
	アメリカ合衆国, 20878 メリーランド,				
	ジャーマンタウン, クラブ ヒル ドライ				
	ブ 20165				

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**